

Aus der I. Medizinischen Klinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff)

Radioimmunologische Bestimmung der Aldosteronkonzentration im menschlichen Plasma

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Bodo v. Ehrlich-Treuenstätt
aus Heppenheim/ Bergstraße

Mainz, 1974

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität

Mainz

(Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff)

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG
DER ALDOSTERONKONZENTRATION
IM MENSCHLICHEN PLASMA

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
den medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Bodo v. Ehrlich - Treuenstätt

aus Heppenheim/Bergstraße

Mainz, 1974

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Spätsommer 1972 bis Winter 1974/75 im Labor für klinische Biochemie der I. Medizinischen Universitätsklinik, Mainz ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. D. Lommer danke ich sehr für die Überlassung des Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit.



Eingereicht am 30. 1.1975

Angenommen vom concilium medicinale am 26.9.1975 mit dem Urteil
summa cum laude

Promotion am 18.11.1975

Fachbereichsdekan: Prof.Dr. E. Straub

Referent : Prof.Dr. D. Lommer

Koreferent : Prof.Dr. H.P. Wolff

Koreferent : Prof.Dr. P. Scriba, München

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	- Kendall's A, 11-Dehydrocorticosteron
	- Aldosterondosis pro Ansatz
%A	- an ein Adsorbens adsorbierte Radioaktivität in %
a	- Gesamtelutionsvolumen in μ l
ACTH	- adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin
AG	- Antigen
AG-AK	- Antigen-Antikörper-Komplex
AK	- Antikörper (= AB - antibody)
Aldo	- Aldosteron
AMA	- Aldosteron-21-monoacetat
APA	- Aldosterone-producing-adenoma
B	- Kendall's B, Corticosteron
	- bound activity = Meßwert der Radioaktivität im Überstand in cpm
	- bound = proteingebundenes Antigen
%B	- prozentualer Anteil der proteingebundenen Radioaktivität im Überstand an der Gesamtradioaktivität
%B ₀	- prozentualer Anteil der proteingebundenen Radioaktivität im Überstand an der Gesamtradioaktivität in Abwesenheit von unmarkiertem Hormon
b	- Gesamtvolumen des Überstandes in ml
BSA	- bovine serum albumin = Rinderalbumin
BvS	- Blank verursachende Stoffe
CH	- charcoal = Aktivkohle
CH/D	- dextran-coated charcoal = Aktivkohle mit Dextranzusatz
Ci	- Curie
CMO	- Carboxymethoxim
cpm	- counts per minute = gezählte Impulse pro Minute
D	- Steigung einer Eichgeraden in Logit-Log-Transformation
DC	- Dünnschichtchromatographie
DOC	- 11-Desoxycorticosteron, Cortexon
11-DOCA	- 11-Desoxycorticosteronacetat
dpm	- desintegrations per minute = Impulse pro Minute
E	- Kendall's E, Cortison
EBD	- Elektrolytbilanzdiät
ECD	- electron capture detector = Elektroneneinfangdetektor
ER	- Exkretionsrate
F	- Kendall's F, Cortisol
	- "Freie" = nicht proteingebundene Radioaktivität
FID	- flame ionisation detector = Flammenionisationsdetektor
γ -GP	- Gammaglobulin-Puffer
GRHA	- glucocorticoid remediable hyperaldosteronism = Glucocorticoid therapierbarer Hyperaldosteronismus
HTSH	- human thyroid stimulating hormone = Thyreoidea stimulierendes Hormon
IHA	- idiopathic hyperaldosteronism = idiopathischer Hyperaldosteronismus
IndHA	- indeterminate hyperaldosteronism = unbestimmter Hyperaldosteronismus
m	- zur Wiederfindungsanalyse eingesetztes Elutionsvolumen in μ l
MW	- Mittelwert (=m)
n	- Teilvolumen des Eluates, das zur Inkubation eingesetzt wird in μ l
NNR	- Nebennierenrinde

17-OHCS	- 17-Hydroxycorticosteroide
P	- Reaktionspartner(Substrat) der spezifischen Immunreaktion
*	- Gesamtmenge Aldosteron in der extrahierten Plasmaprobe
P	- radioaktiv markiertes Substrat = Tracer
PA	- Plasmaaldosteron Konzentration in pg/ml
pA	- Primärer Aldosteronismus
PC	- Papierchromatographie
Prog	- Progesteron
Q	- spezifisch reagierende Protein
R	- Recovery pro 0.1 ml Eluat in %
RAA	- Rening-Angiotensin-Aldosteron-Sytem
Rec	- Recovery = Gesamt wiederfindung in %
RIA	- Radioimmunoassay
RSA	- rabbit serum albumin = Kanninchenalbumin
sA	- sekundärer Aldosteronismus
SD	- standard deviation = Standardabweichung der Einzelbeobachtung
SEM	- standard error of the mean = Standardabweichung des Mittelwertes
SR	- Sekretionsrate
T	- zu Beginn des RIAs zugesetzte Gesamttraceraktivität in cpm
T ¹⁰⁰	- Tetrahydro-11-dehydrocorticosteron
THA	- Tetrahydrocorticosteron
THB	- Tetrahydrocorticosteron
TH-DOC	- Tetrahydro-11-desoxycorticosteron
THF	- Tetrahydrocortisol
THS	- Tetrahydro-11-desoxycortisol
V	- für die Analyse eingesetztes Plasmavolumen
100% v. E.	- Gesamttraceraktivität des vor der Extraktion zugesetzten inneren Standards in cpm
VK	- Variationskoeffizient (= SD in %)
W	- Im Volumen m wiedergefundene Radioaktivität in cpm
Z	- Achsenverschiebung der Logit-Log-Geraden

Inhaltsübersicht

I. THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung
2. Methoden der Aldosteronanalyse im Plasma
 2. 1. Doppelisotopenderivatmethoden
 2. 2. Gaschromatographische Methoden
 2. 3. Radioimmunologische Methoden
3. Physiologie des Aldosterons
 3. 1. Synthese und Regulation
 3. 2. Metabolismus
4. Pathophysiologie und diagnostische Probleme
 4. 1. Primärer Aldosteronismus
 4. 2. Sekundärer Aldosteronismus
 4. 3. Essentielle Hypertonie mit Reninsuppression
5. Die Analyse des Plasmaaldosterons und ihre klinische Bedeutung
6. Theorie der Sättigungsanalyse
 6. 1. Einleitung
 6. 2. Grundprinzip des Radioimmunoassays
 6. 3. Anforderungen an den spezifischen Reaktionspartner Q
 6. 4. Anforderungen an den Tracer P*
 6. 5. Ablauf einer Sättigungsanalyse
 6. 6. Die Produktion von Antiseren
 6. 7. Auswahl eines geeigneten Antiserums
 6. 8. Die Trennung von proteingebundenem Antigen(B) und freiem Antigen (F)
 6. 9. Probenvorbereitung: Extraktion und Chromatographie
 6. 10. Kalkulation der Wiederfindung
 6. 11. Das "Blank"-Problem
 6. 12. Die Assay-Bedingungen
 6. 13. Die Zuverlässigkeitskriterien
 6. 13. 1. Die Richtigkeit ("accuracy")
 6. 13. 2. Die Spezifität ("specificity")
 6. 13. 3. Die Genauigkeit ("precision")
 6. 13. 4. Die Sensitivität ("sensitivity")
 6. 14. Optimierter Assay
 6. 15. Allgemeine Vorschriften für die Routine

II. AUFGABENSTELLUNG

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Entwicklung eines Radioimmunoassays für die Analyse des Plasmaaldosterons
 1. 1. Wahl eines geeigneten Adsorbens zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Aldosteron
 1. 1. 1. Florisil
 1. 1. 2. Aktivkohle
 1. 1. 2. 1. Vergleichende Bestimmung der optimalen Arbeitskonzentrationen für unbeschichtete und dextranbeschichtete Aktivkohle

1. 1. 2. 2. Approximierung der Adsorptionskapazität	58
1. 1. 2. 3. Vergleich von Eichkurven bei Verwendung von unterschiedlichen Mengen Aktivkohle	63
1. 2. Das Antiserum	67
1. 2. 1. Herkunft	67
1. 2. 2. Lagerung des Antiserumvorrates	67
1. 2. 3. Bestimmung des Antiserumtiters	68
1. 2. 4. Haltbarkeit von Antiserum-Arbeitslösungen	72
1. 3. Auswahl und Erprobung geeigneter Inkubationsbedingungen	73
1. 3. 1. Das experimentelle System für den RIA	73
1. 3. 2. Inkubationsvolumen	75
1. 3. 3. Kalkulation der ^3H -Aldosteron-Menge für den RIA	75
1. 3. 4. Inkubationsmedium	75
1. 3. 5. Inkubationszeit und -temperatur	77
1. 3. 6. Reproduzierbarkeit der Eichkurven	84
1. 4. Blutentnahme und Lagerung von Proben	87
1. 5. Extraktion	88
1. 5. 1. Wahl des Extraktionsmittels	88
1. 5. 2. Extraktionsverfahren	89
1. 5. 3. Lösungsmittelvolumen	90
1. 5. 4. Wiederfindungsanalyse	90
1. 6. Versuch zur Vereinfachung der Extraktion: Adsorption der Steroide an XAD-2o Ionenaustauscharze	92
1. 7. Abtrennung von Phenolkörpern und Lipiden	92
1. 8. Entwässern und Einengen der Extrakte	93
1. 9. Chromatographie	94
1. 9. 1. Papierchromatographie (PC)	94
1. 9. 2. Dünnschichtchromatographie (DC)	100
1. 10. Versuche zur Blank-Eliminierung	103
1. 10. 1. Prüfverfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Blank-Phänomens	104
1. 10. 2. Blank-reduzierende Wirkung verschiedener experimenteller Modifikationen	106
1. 10. 2. 1. Papierchromatographische Systeme	106
1. 10. 2. 2. Dünnschichtchromatographische Systeme	107
1. 10. 2. 3. Auswertung	111
1. 11. Kalkulation der Ergebnisse	112
1. 11. 1. Graphische Auswertung des RIAs	112
1. 11. 2. RIA-Auswertung durch EDV	113
2. <u>Ergebnisse</u>	118
2. 1. Zuverlässigkeitskontrollen	118
2. 1. 1. Richtigkeit der Methode	118
2. 1. 1. 1. Analyse von Plasmen mit Aldosteronzusatz unter Intra-Assay-Bedingungen	118
2. 1. 1. 2. Analyse von Plasmen mit Aldosteronzusatz unter Inter-Assay-Bedingungen	119
2. 1. 1. 3. Proportionalitätskontrolle bei Analyse von verschiedenen Volumina von Poolplasmen mit niedrigem und hohem Aldosterongehalt	124

E

2. 1. 2. Spezifität der Methode	127
2. 1. 2. 1. Die Spezifität des Antiserums	127
2. 1. 2. 2. Alkaliwäsche und Papierchromatographie	127
2. 1. 2. 3. Kontrolle unspezifischer Effekte	130
2. 1. 2. 4. Blank-Kontrolle	130
2. 1. 2. 5. Übereinstimmung bei Richtigkeitskontrollen	130
2. 1. 2. 6. Aldosteronspezifische Orthostasereaktion	133
2. 1. 2. 7. Spezifische Aldosteronsuppression unter NaCl-Belastung	133
2. 1. 2. 8. Übereinstimmung der Normalwerte mit Literaturangaben	134
2. 1. 3. Präzision der Methode	134
2. 1. 3. 1. Präzision der Gesamtmethode	134
2. 1. 3. 1. 1. Intra-Assay-Reproduzierbarkeit	135
2. 1. 3. 1. 2. Inter-Assay-Reproduzierbarkeit	136
2. 1. 3. 2. Reproduzierbarkeit des RIAs allein	138
2. 1. 4. Sensitivität der Methode	139
2. 1. 4. 1. Theoretische Sensitivitätsgrenze	141
2. 1. 4. 2. Praktische Sensitivitätsprüfung	142
2. 1. 5. Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse	144
2. 2. Plasmaaldosteron-Tagesprofile	146
2. 2. 1. Circadianer Aldosteronrhythmus bei Normalpersonen	150
2. 2. 2. Aldosteron-, Cortisol- und Reninnachtrythmus bei drei Patienten mit primärem Aldosteronismus	160
2. 3. Plasmaaldosteron in Ruhe und nach 3 Std. Orthostase	160
2. 3. 1. bei Normalpersonen und Patienten ohne Hyperaldosteronismus	160
2. 3. 2. bei einer Patientin mit primärem Aldosteronismus	160
3. <u>Materialien, Methoden und endgültige Modifikation der Gesamtmethode</u>	170
3. 1. Materialien	170
3. 1. 1. Reagentien	170
3. 1. 2. Sonstige Hilfsmittel	170
3. 2. Methoden	170
3. 3. Endgültige Modifikation der Gesamtmethode	170
IV. DISKUSSION	170
V. ZUSAMMENFASSUNG	180
VI. TABELLENANHANG	180
VII. LITERATURVERZEICHNIS	I - XXIII
LEBENS LAUF	

I THEORETISCHER TEIL

1. EINLEITUNG

Seit ADDISON (1855) das nach ihm benannte Krankheitsbild mit der Zerstörung der Nebenniere in Beziehung brachte und BROWN-SEQUARD (1856) die vitale Bedeutung der Nebennieren im Tierexperiment nachwies, konzentrierte sich das Interesse zahlreicher Forschergruppen auf die Nebennieren.

Während KENDALL (1935, 1936), REICHSTEIN und von EUW (1938) sowie WINTERSTEINER (1934, 1936) die Isolierung der wichtigsten Glucocorticoide bereits in den 30er Jahren gelang, gab es für die Existenz eines hochpotenten Na^+ -retinierenden Mineralcorticoids neben dem schon bekannten DOC zunächst nur indirekte Hinweise (KENDALL, 1940; HARTMANN, 1939, 1940 und 1942; DEANE, 1948; LUETSCHER, 1951). Die Isolierung und Strukturaufklärung des Aldosterons durch S.A.SIMPSON, J.F.TAIT et al. (1953) war schließlich das Ergebnis einer zielstrebigten Suche nach diesem Mineralcorticoid.

Bereits zuvor hatte DORFMANN (1947) einen Bioassay zum Nachweis einer mineralcorticoiden Wirkung von biologischen Extrakten entwickelt und BUSH (1952) und ZAFFARONI (1950) hatten papierchromatographische Trennverfahren für Corticosteroide beschrieben.

Seit der Isolierung des Aldosterons und der nachfolgenden Synthese durch SCHMIDLIN (1955) wurden zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie und Pathophysiologie des Aldosterons gewonnen. Voraussetzung hierfür waren geeignete mikroanalytische Methoden zur Bestimmung des Aldosterons, seiner Präkursoren und Metaboliten in Geweben und biologischen Flüssigkeiten.

Die wichtigsten Methoden zur Bestimmung des Plasmaaldosterons werden im nachfolgenden Abschnitt in der Reihenfolge ihrer Entwicklung kurz dargestellt.

2. METHODEN DER ALDOSTERONANALYSE IM PLASMA

Die morgendliche Aldosteron-Konzentration im peripheren menschlichen Plasma von Normalpersonen beträgt 20-100 pg/ml (MAYES, 1970; LOMMER, 1974; St. CYR, 1972; VARSANO-AHARON, 1973). Geht man davon aus, daß in der Routinediagnostik höchstens 5 ml Plasma für eine Analyse zur Verfügung stehen, und nach den zur Erzielung einer ausreichenden Spezifität notwendigen Reinigungsschritten nur mit einer Ausbeute von maximal 50 % zu rechnen ist, so muß man für einen praktikablen Aldosteronassay eine Sensitivitätsgrenze unter 125 pg fordern, um nur Normalkonzentrationen erfassen zu können. Zum Nachweis eines Hypoaldosteronismus, zur Durchführung von Suppressionstests, bei Verwendung kleinerer Plasmaproben oder bei geringeren Ausbeuten ist eine entsprechend größere Empfindlichkeit der Methode erforderlich.

Aufgrund dieser Überlegungen scheiden die klassischen fluorometrischen Methoden für die Aldosteronanalyse im Plasma aus. Die Sensitivität dieser Methoden liegt zumeist im ng-Bereich und die Bestimmungsreaktionen selbst sind zumeist so unspezifisch, daß verlustreiche Reinigungsprozeduren notwendig wären (Übersichten bei BRODIE & TAIT, 1969 and VECSEI, 1972).

Die für Plasmaanalysen notwendige Spezifität und Sensitivität wird nur mit Doppelisotopenderivatmethoden, einigen gaschromatographischen Verfahren mit Elektronen-Einfang-Detektor und radioimmunologischen Techniken erzielt.

2.1. Doppelisotopenderivatmethoden

Die Doppelisotopenderivatmethode wurde 1954 von AVIVI et al. als mikroanalytisches Verfahren in die Biochemie eingeführt. Folgendes Prinzip liegt ihr zugrunde:

Einem Untersuchungsmaterial wird eine definierte Menge der zu analysierenden Substanz in markierter Form, z.B. mit ^{14}C , als Verlustindikator zugesetzt. Aus der Abnahme der ^{14}C -Radioaktivität in der Probe während des Analysenganges lassen sich die prozeduralen Verluste berechnen. Der quantitative Nachweis der Testsubstanz erfolgt nach Reaktion mit einem ^3H -markierten Reagens, z.B. Essigsäureanhydrid, also in Form eines markierten Derivates - in dem genannten Beispiel als Mono- oder Diacetat.

Daraus ergeben sich die beiden Hauptvorteile der Methode:

Die Verwendung radioaktiver Verlustindikatoren für analytische Zwecke ermöglicht quantitative Analysen, auch wenn die Bestimmungsreaktion nicht quantitativ abläuft.

Radioaktive Derivate als Indikatoren für die quantitative Analyse selbst ermöglichen hochempfindliche Messungen.

Demgegenüber ist als Hauptnachteil dieser Methode zu nennen:

Wegen der relativ geringen Spezifität der Derivatbildungsreaktion sind umfangreiche und verlustreiche chromatographische Vorreinigungen nötig.

Die Anwendung der Doppelisotopenmethode für Aldosteronanalysen wurde erstmals von KLIMAN & PETERSON (1958, 1960) beschrieben. Sie verwendeten ^3H -Essigsäureanhydrid als Reagens zur Derivatbildung und konnten Aldosteron im menschlichen Urin und im Nierenvenenplasma von Hunden bis zu einer Sensitivitätsgrenze von 10 ng/Probe nachweisen. BOJESEN et al. (1961) gelang als ersten die Bestimmung von Aldosteron im peripheren menschlichen Plasma unter Verwendung von Tosan- ^{35}S als Markierungsreagens.

KÖDDING, WOLFF et al. (1961, 1962, 1963) entwickelten etwa zur gleichen Zeit eine sehr empfindliche Doppelisotopenmethode mit Essigsäureanhydrid zur Bestimmung von Aldosteron im peripheren menschlichen Plasma. Die außergewöhnliche Sensitivitätsgrenze von 1 ng/Probe wurde durch Messungen der ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ und ^3H als $^3\text{H}_2\text{O}$ in der Gasphase erreicht.

In der Folgezeit wurden verschiedene Modifikationen dieser Doppelisotopenmethoden für die Aldosteron-Bestimmung entwickelt. (PETERSON, 1964; BRODIE, 1967; COGHLAN, 1967; BOJESEN, 1964, 1966; FRASER, 1967; AGUILERA, 1972; SEALEY, 1972).

Alle diese Methoden erfordern 4-5 chromatographische Reinigungsschritte und sind somit sehr zeit- und kostenaufwendig. Obwohl sie aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität für die Bestimmung von Plasma-Aldosteron prinzipiell geeignet sind, konnten sie sich für die klinische Routinediagnostik nicht durchsetzen.

2.2. Gaschromatographische Methoden

Die gaschromatographische Bestimmung von polaren Steroiden wie Aldosteron ist wegen deren großer Thermolabilität problematisch. Die Instabilität des Aldosterons bei hohen Temperaturen zwingt dazu, vor der Gaschromatographie durch geeignete chemische Reaktionen weniger polare

thermostabilere Derivate herzustellen und diese dann zu analysieren. Als eines der am besten geeigneten Derivate hat sich das 11- β -hydroxy-3-keto-4-ätiensäure-18-al-18-11-hemiacetal-20, 18-lacton- kurz γ L a c t o n - erwiesen, das sich durch Oxidation mit Perjodsäure aus Aldosteron herstellen läßt (MERITS, 1962). Gaschromatographische Verfahren mit diesem Derivat wurden von zahlreichen Autoren beschrieben (RAPP & EIK-NES, 1966; AAKVAAG, 1967; SALOKANGAS, 1967; PALEM, 1970; BRAVO, 1967; WORDSÖRFER, 1972). Darüber hinaus wurden verschiedene andere Methoden unter Verwendung folgender Aldosteronderivate mit unterschiedlichem Erfolg erprobt:

Aldosteron - Trimethylsilyläther (TMSi)	(HORNING & MAUME, 1969)
Aldosteron - o-methoxime-trimethylsilyläther (MO-TMSi)	(GARDNER & HORNING, 1969; HORNING & MAUME, 1969)
Aldosteron - acetat-methoxim-trimethylsilyläther (Ac-MO-TMSi)	(HORNING & MAUME, 1969)
Aldosteron - methoxim-heptafluorobutyrylester (MO-HFB)	(HORNING & MAUME, 1969; MAUME, 1971)
Aldosteron-- monoacetat	(RAPP & EIK-NES, 1965, 1966)
Aldosteron - 18-21-diacetat	(WOTIZ, 1961; KLIMAN, 1962; RAPP & EIK-NES, 1966)

Die Eignung der Derivate als analytische Indikatorsubstanzen ist nicht nur aufgrund ihrer Thermostabilität zu beurteilen. Unvollständig ablaufende Reaktionen können zu Derivaten verschiedener Reaktionsstufen führen, die im Gaschromatogramm dann zu mehreren Aldosteron-Derivat-Peaks führen, wenn nicht eine vorherige papier- oder dünnschichtchromatographische Trennung durchgeführt wird (KLIMAN, 1965).

Von entscheidender Bedeutung für die Sensitivität der Methode ist der verwendete Detektor: Während mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) nur eine Empfindlichkeit bis etwa 5 ng (WORDSÖRFER, 1972) erreichbar ist (AAKVAAG, 1971), können mit einem Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) auch noch Analysen bis in den Subnanogramm-Bereich durchgeführt werden (RAPP & EIK-NES, 1966; AAKVAAG, 1967, 1971; HORNING, 1969; PALEM, 1970; BRAVO, 1967). Daraus ergibt sich, daß die praktikablen gaschromatographischen Methoden mit FID für Urinalysen Anwendung finden können. Mit gaschromatographischen Methoden mit ECD ist jedoch prinzipiell auch die Analyse von Plasmaaldosteron möglich (NICOLIS, 1969).

Hinsichtlich der Praktikabilität sind die gaschromatographischen Methoden mit FID für Urinanalysen vorteilhafter als die Doppelisotopenmethoden, aber zugleich noch erheblich aufwendiger als Radioimmunoassays.

Plasmaanalysen sind gaschromatographisch mit ECD ähnlich problematisch wie die Doppelisotopenmethoden und routinemäßig nicht durchführbar.

2.3. Radioimmunologische Methoden (RIAs)

Das Prinzip des Radioimmunoassays wird in einem späteren Abschnitt noch ausführlich erläutert. An dieser Stelle sollen speziell die bisher publizierten RIAs für Plasmaaldosteron systematisch bewertet werden.

Wie aus den vorangegangenen Ausführungen hervorgeht, gab es bereits vor der Einführung des RIA für Aldosteron recht zuverlässige analytische Methoden, die bereits viele Erkenntnisse über die physiologische Rolle des Aldosterons erbrachten. Aber auch Gaschromatographie und Doppelisotopenmethode mußten für die Plasmaaldosteronanalyse bis an die Grenzen ihrer Möglichkeiten ausgeschöpft werden.

In den RIA wurden also gerade im Hinblick auf das Plasmaaldosteron besondere Erwartungen geknüpft.

HANING stellte 1970 die ersten gegen ein Aldosteron-Protein-Konjugat gezüchteten Aldosteron-Antikörper zur Verfügung (HANING, 1972) und im gleichen Jahr wurden von MAYES (1970) und BAYARD (1970) die ersten Aldosteron-RIAs publiziert. Auch andere Autoren gelang es bald darauf, Antiseren mit hoher Spezifität gegen Aldosteron in Kaninchen oder Schafen zu züchten (AFRICA, 1971; VECSEI, 1972; MERÉTEY, 1973; LADER, 1973; NEWSOME, 1973; VETTER, 1973). Dennoch reichte die Spezifität der Immunreaktion in keinem Fall aus, um eine Analyse im unveränderten Plasma durchzuführen. Eine vorherige Extraktion und mindestens ein Reinigungsschritt - in den meisten Fällen eine Chromatographie - waren in fast allen bisher beschriebenen RIAs für Plasmaaldosteron notwendig (MAYES, 1970; BAYARD, 1970; ITO, 1972; St. CYR, 1972; CORVOL, 1972; FRASER, 1972; BARTORELLI, 1973; JOWETT, 1973; VECSEI, 1973). Die potentielle Einfachheit des RIAs wird dadurch zum Teil aufgehoben. Dennoch ist die Verringerung des labortechnischen Aufwandes gegenüber dem Doppelisotopenassay beträchtlich. Durch die präliminaren Reinigungsschritte ergab sich ein neues Problem, das bei Peptid-RIAs unbekannt war: Der "Blank", d.h. falsch positive oder negative Leerwerte aufgrund

von Lösungsmittel- oder Eluat-Rückständen (PIZZARRO, 1972).

Beim Aldosteron-RIA im Urin stellt sich das Problem der Vorreinigung nicht in diesem Ausmaß, da mit dem Aldosteron-18-glucuronid ein Metabolit zur Verfügung steht, der selektiv durch Säurehydrolyse isoliert werden kann. Eine Chromatographie ist beim Urin-RIA also nicht unbedingt notwendig (WAHLEN, 1970).

1973 wurden von einigen Autoren RIAs für Plasmaaldosteron ohne Chromatographie beschrieben. Die zu geringe immunologische Spezifität wurde von VARSANIO-AHARON & ULICK (1973) und FARMER (1973) durch Flüssigkeitsverteilung und anschließende Perjodsäure Oxidation des Aldosterons zu Aldosteron-Etiolacton, welches mit Aldosteron-Antikörpern oft äquimolar kreuzreagiert (HANING, 1972; FARMER, 1970), erhöht.

MARTIN & NUGENT (1973), GOMEZ-SANCHEZ (1973) und die Arbeitsgruppe von VECSEI (1974) entwickelten RIAs ohne Chromatographie mit vorheriger immunologischer Reinigung. Nur VETTER u. Mitarb. (1972, 1973, 1974) berichteten über ein Antiserum, dessen immunologische Spezifität allein ohne vorherige Reinigungsschritte einen zuverlässigen Assay ermöglicht.

Nach Ansicht von LOMMER und VECSEI (1974) ist derzeit der Aldosteron-Assay mit Chromatographie das zuverlässigste Verfahren für die Plasmaaldosteronbestimmung in der Routine.

Eine Übersicht der bisher publizierten Plasmaaldosteron-RIA-Techniken und die Ergebnisse der Zuverlässigkeitsprüfungen geben die folgenden Tabellen:

Tab. I a - c:

Tab. 1a : Radiolimmunoassays für Plasmaaldosteron - Methodik

Tab. 1a : Radiolimmunoassays für Plasminogen, Plasminogenaktivator und Plasmin

Autor	ANTISERUM				Pl.Vol.			Extraktion
	Imm. AG ¹⁾	Spezies	Titer 1:	Spezif. ²⁾ %	(ml)	Lg.mittel	Pl/Lgm (Vol)	
MAYER, 1970	-oxim-BSA ³⁾	Kaninchen	8×10^3	B 1	1-5	CH ₂ Cl ₂	1/5	
BAYARD, 1970	-3-CMO ⁴⁾ -RSA ⁵⁾ -18-21-diacetat-RSA	Kaninchen	$1,5 \times 10^2$	B 2 F 0,01 E 0,01 AMA 50,0	5-20	CH ₂ Cl ₂	1/15	
ITO, 1972	-3-CMO-BSA -18-21-disuccinat-BSA	Kaninchen Schaff	10^4 10^6	DOC 0,5 Fludro-E 0,5	2	CH ₂ Cl ₂	$2 \times 1/5$	
St. CYR, 1972	-18-21-disuccinat	Schaf	4×10^6	Ald- δ -lacton Testosteron	5-8	CH ₂ Cl ₂	1/7	
JOWETT, 1973	-3-CMO-BSA	Kaninchen	$10^2 - 2,5 \times 10^2$	DOC 1,69 B 0,82	2	CH ₂ Cl ₂	1/5	
FARMER, 1973	Aldo- δ -lacton-CMO-BSA	Kaninchen Schaf	$1,5 \times 10^6$ $1,8 \times 10^6$	Aldo 100	1-2	CH ₂ Cl ₂		
VARSANO-AHARON, 1973	Aldo-dihemisucc.-BSA	Schaf	10^5	Aldo-eti-lacton 35	2-4	CH ₂ Cl ₂	1/6-1/12	
GOMEZ-SANCHEZ, 1973	-18-21-disuccinat				0,5-2	CH ₂ Cl ₂	1/10	
MARTIN, 1973	AB ⁶⁾ I: -3-CMO-BSA AB II: 18-21-disuccinat-BSA	Kaninchen Schaf		DOC B	2			
VETTER, 1973	-oxim-B G	Kaninchen	8×10^3 8×10^2	DOC B	2	CH ₂ Cl ₂	$3 \times 1/2$	

Tab. 1b : Radioimmunoassays für Plasmaaldosteron - Methodik

A u t o r	Reinigung	Puffer		Subst.	Prot.	Incubation		Separationstechnik	
		pH				t	oC	Material	Menge
MAYES, 1970	1 PC, 1 Silicasäule, Alkaliw.-Meth. elution	8,0		0,05 m Borat + 2 % Methanol	0,6 % Glob. Methanol	5 h	?	ges.kalt. (NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 ml
BAYARD, 1970	1 PC, Alkaliw. Meth. elution					20 h	37°	aktiviertes Florasil	10-40 mg
ITO, 1972	a) 1 PC, B 5 Meth.elution b) 1 LH-20-CC Meth.elution Alkaliw.	7,4		0,1 m Borat	0,6 % BSA	1-2 h	5°	aktiviertes Florasil	30 mg
St. CYR, 1972	Flüss.-Vert. Alkaliw. 1 TLC	7,0		0,1 m Borat		17-48h	4°	CH/D ⁷	0,025 %/ 0,5 ml
JOWETT, 1973	PC:Wharm.SG 81 Elution m.Phosphat- puffer	7,4		Sensen Phosphat 0,6 mmol/l		Vorinkubat. 1 h	37°	Toloolextr.	2 x 5 ml
FARMER, 1973	Flüssigkeitsvert. Perjodäureoxid. Alkaliwäsche	8,9		0,05 m Borat	0,1 Gelatine	Inkubation 16 h	4°	CH/D	5 %/100 ul
VARSANO-AHARON 1973	Flüssigkeitsvert. Perjodäureoxid. Alkaliwäsche	7,0		0,05 m Phosphat		30 h	23°	CH/D	
						+ 30h	4°		
GOMEZ-SANCHEZ, 1973	Antikörper II: immu- nologische Reinigung	8,0		0,05 m Borat	BSA Glob.	6-12h	7-10°	CH/D +0,6% Gelat.	1/006 0,25 ml
MARTIN, 1973	Corticosteroidbindung an endog. Protein, Aldoad- sorption an Fuller's Erde, Abtrennung mit AB 1 Alkaliwäsche	8,0		0,05 m Borat	0,06 H 86 + 0,16 BSA	1 h	20°	(NH ₄) ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 ml

Tab. 1c: Radioimmunoassays für Plasmaldosteron - Ergebnisse

Autor	ERGEBNISSE					Richtigkeit $y = ax + b$ R	Blank pg/Probe	Gesamt Recovery	Normalwerte 11) ad lib Na Diät pg/ml R: Ruhe 0: ca. 4 h Orthostase
	Sensitiv. 8) pg / Ansatz	Präzision 9) u m σ (Var. Koeff. %)							
MAYES, 1970	20	5,5 5,7	-		a: 0,968 b: +1,06	0+2 (SD)	77,0 + 5,2		R: 74 + 42 0: 132 + 89
BAYARD, 1970	5	14 13,2	10,5		?	88 + 55	66,3 + 13,6		R: 13,5 + 1,05 0: 122 + 74
ITO, 1972 10)	6	PC: 21	-	4,7	a: 1,05 b: -3,9		PC: 62,2 + 10,6		
		CC: 11 (19)	-	-	a: 1,0 b: 2,2	6	CC: 56,5 + 14,0		
St. CYR, 1972	3	5,45	Intraassay		a: 0,968 b: +1,07 R: 0,998	5,21 + 3,2	51,88 + 6,24		R: 76 + 22 0: 155 + 66
JOWETT, 1973	1,7		Intraassay: 6,6 interassay: 7,3		-	-	64,0 + 7,4		
FARMER, 1973	-		interassay: 10,6 14,1	-	-	2-5	35-45		R: 43,5 0: 148,9
VARSANO-AHARON 1973	4 prakt: 10	10,9 2,2	-	-	-	+0	45 + 7		R: 80 + 20 0: 112 + 19
GOMEZ-SANCHEZ, 1973	4	12,8 9,0	6,4		a: 1,05 b: +1,69	4	63,8 + 11,5		
MARTIN, 1973	?	36 9	11			23 + 16	5-6,5 %		
VETTER, 1973	5	9,0 + 10,6 13,5 - 15,0	Intra intera.			+0	92,4 + 4,8 kein Verlustindikator!		

Fußnoten zu den Tabellen 1 a - c :

1. Genannt ist das Aldosteronderivat, das den Tieren zur Immunisierung appliziert wurde.
2. Hier sind, soweit in den Arbeiten angegeben, die am stärksten kreuz-reagierenden Steroide aufgeführt. Die Angaben erfolgen soweit als möglich in % nach ABRAHAM (1969).
3. BSA = Rinderserumalbumin
4. CMO = Carboxymethoxim
5. RSA = Kaninchenserumalbumin
6. AB : Antikörper
7. CH/D = dextranbeschichtete Aktivkohle
8. Hier sind, soweit aus den Originalarbeiten zu entnehmen, die theoretischen Sensitivitäten als die Mengen Aldo in pg angegeben, die dem Mittelwert abzüglich der 2fachen Standardabweichung für %B bei 0 pg entsprechen ($\%B_0 (MW - 2SD)$).
9. Die Angaben zur Präzision sind nur bedingt vergleichbar, da nicht alle Autoren die Bereiche angeben, für die die Präzision bestimmt wurde. Wo nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden die Interassay-Variationskoeffizienten in % für den unteren Bereich ("u" $\hat{=}$ ca. 40 pg), für den mittleren Bereich ("m" $\hat{=}$ ca. 200 pg) und den oberen Eichkurvenbereich ("o" $\hat{=}$ ca. 500 pg) angegeben.
10. In dieser Spalte werden Ergebnisse der papierchromatographischen (PC) und der säulenchromatographischen (CC) Methode genannt.
11. Die Normalwerte sind nur bedingt vergleichbar, da die äußeren Bedingungen der Bestimmungen meist nicht standardisiert waren.

Nicht in diese Übersicht aufgenommen wurden die Methoden von VECSEI (1973) und BANKS (1971), da nur Urin RIAs berichtet werden. Die Arbeit von CORVOL (1972) wurde mangels detaillierter Angaben nicht aufgeführt.

3. PHYSIOLOGIE DES ALDOSTERONS

Aldosteron ist das stärkste natürlich vorkommende Mineralcorticoid. Seine Wirkung besteht in der Verstärkung der Na^+ -Rückresorption und K^+ -Sekretion im distalen Tubulus der Niere (HORTON, 1973; ADAMSON, 1972).

Die Synthese des Aldosterons in der zona glomerulosa der Nebennierenrinde wird durch ein komplexes Kontrollsystem gesteuert (LOMMER, 1974; HORTON, 1970, 1973).

3.1. Synthese und Regulation

Aldosteron ist das Endglied des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Regelkreises (RAA-System), der zur Aufrechterhaltung der Volumenhomöostase dient (WERNING, 1972; TOBIAN, 1960; GANGONG, 1966). Im juxtaglomerulären Apparat der Niere wird bei Volumeneinschränkung, Na^+ -Restriktion oder Mangel durchblutung der Niere die Peptidase Renin gebildet (TOBIAN, 1960; DAVIS, 1971), welche im Blut aus dem hepatischen alpha-Globulin Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I abspaltet, das dann unter Einwirkung des vorwiegend in der Lunge vorkommenden "converting enzyme" um weitere zwei Aminosäuren zu Angiotensin II, dem wichtigsten aldosteronotropen Hormon, verkürzt wird. Angiotensin II stimuliert direkt die Aldosteronsynthese und Sekretion (LARAGH, 1960; MULROW, 1960; BLAIR-WEST, 1963, 1965; BIRON, 1969; MILLER, 1968).

Die dadurch bewirkte Na^+ -Retention führt zu einer Erhöhung des Blutvolumens, die wiederum einen adäquaten Reiz zur Drosselung der Reninproduktion darstellt (VANDER, 1967). Es besteht demnach eine negative Rückkoppelung zwischen Aldosteronwirkung und Reninfreisetzung.

Bei der Regulation der Aldosteronsekretion spielen aber neben dem RAA-System auch ACTH, der K^+ - und Na^+ -Spiegel sowie möglicherweise noch weitere unbekannte Faktoren eine Rolle. ACTH vermag die Aldosteronsekretion kurzzeitig und weniger spezifisch als Angiotensin II zu stimulieren (HORTON, 1970; GANGONG, 1966; BLAIR-WEST, 1963; SCHOLER, 1973). Überschuß an K^+ -Ionen (KAPLAN, 1965; FUNDER, 1969; DLUHY, 1972; GANN, 1964; COOKE, 1973; SCHOLER, 1973) und Mangel an Na^+ -Ionen (COGHLAN, 1972; BLAIR-WEST, 1963; McCAA, 1973) bewirken ebenfalls eine direkte Steigerung der Aldosteronsekretion.

Die Annahme, daß noch weitere u n b e k a n n t e aldosteronotrope Substanzen existieren, wird durch die Beobachtung des pseudoprimären Aldosteronismus (JAHNECKE, 1974; BLAIR-WEST, 1971) sowie durch Untersuchungen an Patienten unter Na^+ -Restriktions-Diät und an nephrektomierten Patienten gestützt (HORTON, 1970; MITRA, 1972; McCAA, 1972; WEIDMANN, 1972; COGHLAN, 1972).

Ob etwa die Stimulationswirkung des Prostaglandins PGA_1 auf Aldosteron ohne gleichzeitige Veränderungen des ACTH-, Renin- und Serumelektrolytspiegels physiologische Bedeutung besitzt ist noch offen (FICHMAN, 1973; CARR, 1973).

Bemerkenswert ist, daß der Aldosteronblutspiegel selbst keinen negativen Rückkoppelungseffekt auf die Aldosteronsekretion zu haben scheint (HORTON, 1970).

3.2. Metabolismus

Im Gegensatz zu den Glucocorticoiden besitzt Aldosteron im Plasma kein spezifisches Bindungsprotein, sondern es ist lediglich unspezifisch an Albumin assoziiert (HORTON, 1970, 1973). Diese Tatsache hat eine Reihe von bedeutsamen Konsequenzen für den Aldosteronstoffwechsel:

Die biologische Halbwertszeit ist sehr gering, etwa 30 - 40 min (TAIT, 1961; WOLFF & LOMMER, 1965; LOMMER, 1968).

Die metabolische Clearancerate (MCR) ist sehr hoch, etwa 1 600 l/die (TAIT, 1961; LOMMER et al., 1968, 1972).

Soweit Aldosteron die Leber passiert, wird es dort nahezu vollständig (95 - 98 %) extrahiert (LOMMER, 1968).

Aldosteron ist daher nach oraler Applikation inaktiv.

Diese Besonderheiten des Aldosteronstoffwechsels haben einerseits zur Folge, daß plötzliche Schwankungen der Aldosteronsekretion sich sehr schnell in der Plasma-Konzentration wieder spiegeln, und andererseits bleibt die absolute Plasma-Konzentration dadurch extrem niedrig (20-100 pg/ml in Ruhe bei Normalpersonen) (HORTON, 1970; LOMMER, 1974).

Der Abbau des Aldosterons erfolgt in zwei anatomisch getrennten Räumen: 5 - 40 % des sezernierten Aldosterons wird in der Leber zu Tetrahydroaldosteronglucuronid metabolisiert (COPPAGE et al., 1962; NEHER, 1963) und 10 - 15 % wird in der Niere in Aldosteron-18-glucuronid, die sogenannte "pH-1-labile Substanz", überführt (BLEDSOE, 1966; HORTON, 1970). Letztere wird gewöhnlich zur Bestimmung der Aldosteronexkretionsrate im Urin herangezogen.

Der verbleibende Anteil wird zum geringen Teil als unverändertes Aldosteron, zu 20–25 % in Form verschiedener nach β -Glucuronidase-Einwirkung extrahierbarer Metaboliten und zu 10–15 % in Form Butanol-extrahierbarer Substanzen ausgeschieden (NEHER, 1963).

Die Bestimmung der Aldosteronexkretionsrate (ER) oder der Sekretionsrate (SR) aus dem 24-h-Sammelurin von Patienten ergibt immer ein integrierendes Bild der Aldosteronsynthese und des Aldosteronstoffwechsels über den Zeitraum der Sammelperiode. Bei Patienten mit Nieren- oder Lebererkrankungen birgt die ER die Gefahr von Fehlinterpretationen in sich (WOLFF, 1963). Bei der SR sind solche Fehler durch Einführen eines Korrekturfaktors vermeidbar (LOMMER, 1972).

Der Aldosteron-Plasmaspiegel gibt Auskunft über die Menge biologisch wirksamen Hormones am Zielorgan. An Hand des Plasmaaldosteronspiegels läßt sich die hohe Empfindlichkeit demonstrieren, mit der das RAA-System auf äußere Reize wie Änderung der Körperlage (BALIKIAN et al., 1968; KATZ, 1972), natriumarme oder natriumreiche Diät (AXELROD and LUETSCHER, 1954; WILLIAMS, 1972) und die Tageszeit (KEM et al., 1970) reagiert. Darüber hinaus wurden von KATZ (1972) geschlechtsspezifische Unterschiede und bei Frauen zyklusabhängige Schwankungen des Plasmaaldosteronspiegels festgestellt (KATZ, 1972). JUNG et al. (1971) berichten über Alters- und Höhenabhängigkeiten des Plasmaaldosteronspiegels. Bei Normalpersonen steigt das Plasmaaldosteron sogar beim Übergang von der liegenden in die sitzende Position praktisch sofort an: Mit der vorliegenden Methode durchgeführte Tagesprofilstudien ergaben, daß bereits das Aufsetzen im Bett zur Nahrungsaufnahme einen deutlichen Anstieg des Plasmaaldosterons bewirkt. Beim Übergang in Orthostase erfolgt ein Anstieg bis zum 6fachen des Basiswertes (KATZ et al. 1972; HORTON, 1970, 1973). Es bestehen jedoch ausgeprägte interindividuelle Schwankungen sowohl bei den Ausgangswerten, als auch in der Reaktion auf den Orthostasereiz (LOMMER, 1974; ODA, 1971). Ursache der positionsabhängigen Veränderung des Plasmaaldosteronspiegels ist die dabei auftretende Veränderung der Nierendurchblutung (LOMMER, 1974). In Orthostase kommt es sowohl zu einer Sekretionssteigerung als auch zu einer Clearanceverminderung (HORTON, 1973).

Die Na^+ -Zufuhr beeinflußt den Aldosteron-Plasmaspiegel einerseits über das RAA-System und andererseits durch direkte Wirkung auf die Aldosteronsekretion. Unter Na^+ -Restriktion erhöht sich der Aldosteron-Plasmaspiegel in Ruhe und steigt auf Orthostasereiz zu extremen Werten an (HORTON, 1973; COGLAN et al., 1972). MICHELAKIS und HORTON (1970) konnten zeigen, daß der Plasmaaldosteronspiegel einen dem Renin-Tagesprofil entsprechenden circadianen Rhythmus aufweist, dessen höchste Werte in den Morgenstunden erreicht werden. Diese Ergebnisse

wurden von LOMMER et al. (1974) und KEM et al. (1970, 1973) bestätigt. Darüber hinaus erfährt das Tagesprofil Modifikationen durch episodische Sekretionsperioden (KATZ et al., 1972; VAGNUCCI et al., 1974; VETTER et al., 1974).

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß Plasmaaldosteron-Analysen nur unter klinisch streng standardisierten Bedingungen zu vergleichbaren Ergebnissen führen können und daher grundsätzlich stationär unter Beachtung folgender Regeln durchgeführt werden sollen (LOMMER, 1974):

1. Alle Medikamente, die den Salz- und Wasserhaushalt, das RAA-System oder das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindensystem beeinflussen, sind mindestens zwei Wochen vor der Untersuchung abzusetzen.
2. Isotopenuntersuchungen müssen in der gleichen Zeit unterbleiben.
3. Mindestens drei Tage vor der Untersuchung erhält der Patient eine Elektrolytbilanzdiät von 100–120 mval Na^+ und 60–80 mval K^+ /die.
4. Stress ist zu vermeiden.
5. Die Blutproben sind zu festgelegten Tageszeiten zu entnehmen.
6. Es ist mindestens ein Ruhe und ein Stimulationswert nach 3 Stunden Orthostase zu bestimmen.

4. PATHOPHYSIOLOGIE UND DIAGNOSTISCHE PROBLEME

Störungen des Aldosteronstoffwechsels können sich entweder als Hyperaldosteronismus oder als Hypoaldosteronismus manifestieren. Eine nosologische Klassifizierung dieser beiden Leitsymptome findet sich in der Aldosteron-Monographie von GLAZ und VECSEI (1971), bei JAHNECKE (1974) und bei WERNING (1972). Von diagnostischer Bedeutung sind hauptsächlich die verschiedenen Formen des Hyperaldosteronismus (DISTLER, 1972), die zu den Mineralcorticoidsyndromen gezählt werden.

Störungen im Gleichgewicht des RAA-Regelkreises können grundsätzlich in zwei Kategorien eingeteilt werden:

1. Von **p r i m ä r e m** Aldosteronismus spricht man, wenn eine angiotensinunabhängige Überproduktion von Aldosteron vorliegt. Die Plasmapreninaktivität ist hierbei charakteristisch erniedrigt.
2. Von **s e k u n d ä r e m** Aldosteronismus spricht man, wenn der Sekretionsreiz für die Aldosteronüberproduktion extraadrenokortikal gelegen ist. Er wird nach DISTLER (1972) und JAHNECKE (1974) eingeteilt in

a) Formen mit Hyperreninämie

b) Formen mit Reninsuppression

Im ersteren Fall ist der Aldosteronspiegel sekundär aufgrund verstärkter Reninfreisetzung durch Ursachen, die zu Hypovolämie oder eingeschränkter Nierendurchblutung führen, erhöht.

Die Zuordnung zu Kategorie 2 b erfolgt bisher nicht einheitlich: Während nach BIGLIERI (1972, 1974) und LOMMER (1974) der idiopathische Hyperaldosteronismus (IHA) zu den Formen des primären Hyperaldosteronismus gerechnet wird, ordnet JAHNECKE (1974) dieses Syndrom als "pseudoprimären Aldosteronismus" unter die sekundären Aldosteronismusformen mit Reninsuppression ein.

4.1. Primärer Hyperaldosteronismus (pA) - Conn-Syndrom

Bei dem von CONN (1955, 1, 2) erstmals beschriebenen Syndrom handelte es sich um die ausgeprägte Form einer sekundären Hypertonie, deren Ursache eine gesteigerte Aldosteronsekretion aufgrund eines Nebennierenrindenadenoms war. Durch die chirurgische Entfernung des Adenoms konnte die Hypertonie geheilt werden.

Diese Form des Aldosteronismus wird als primär bezeichnet, weil die Störung in der Nebennierenrinde selbst lokalisiert ist. Der pA imponiert klinisch meist durch die Leittrias (HORTON, 1973)

Hypertonie	
Hypokaliämie	1
Alkalose	

¹ Neuerdings wurde bei einigen Patienten mit gesichertem pA eine Normokaliämie beobachtet (CONN et al., 1966; WOLFF, 1968). Es wird diskutiert, daß es sich in diesen Fällen um Initialstadien eines pA handelt.

Dazu kommen in unterschiedlicher Häufigkeit eine systematische Hyperkaliurie, neuromuskuläre Störungen aufgrund der Hypokaliämie, Nykturie, frontale Kopfschmerzen, ein latenter oder sogar manifeste Diabetes und weitere Symptome (GLAZ und VECSEI, 1971). Die verstärkte Na^+ -Retention führt zu einer positiven Na^+ -Bilanz und isotoner Flüssigkeitsretention, so daß das Plasma- Na^+ im wesentlichen normal bleibt (HORTON, 1973). Da eine aldosteronombedingte Hypertonie in 95 % chirurgisch geheilt oder zumindest gebessert werden kann (CONN, 1964; CAIN et al., 1972; VETTER et al., 1973), stellt das Conn-Syndrom eine wichtige Differentialdiagnose der chronischen arteriellen Hypertonie dar, auch wenn es im Gesamtkollektiv der Hypertoniker nur 1-2 % (HORTON, 1973; WALDHÄUSL, 1974) ausmacht. Als Screening-Methode zur Erkennung eines Hyperaldosteronismus bei neu entdeckten Hypertonikern empfiehlt HORTON (1973) den Versuch, eine Hypokaliämie durch 5-7tägige salzreiche Diät zu provozieren. Nach LOMMER (1974) hat sich auch die Bestimmung der Aldosteronexkretionsrate als Suchmethode gut bewährt.

Der pA ist bisher die einzige Hochdruckform, bei der die pathogenetische Rolle des RAA-Systems nachgewiesen werden konnte (WOLFF, 1971). Offensichtlich bedarf es jedoch zusätzlicher Voraussetzungen, damit sich ein Hyperaldosteronismus als Hypertonie manifestiert. Nur die Störung einer primär intakten Homöostase durch übermäßige Sekretion von Aldosteron führt zur Hypertonie (JAHNECKE, 1974).

DISTLER (1973) nimmt an, daß die Hypertonie bei pA im Initialstadium auf ein erhöhtes Herzzeitvolumen, im chronischen Stadium auf einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand zurückzuführen ist.

BIGLIERI (1972) unterscheidet vier Typen des primären Aldosteronismus:

1. Das aldosteronproduzierende Adenom (APA) = Conn-Syndrom
2. Den idiopathischen Hyperaldosteronismus (IHA) - entsprechend dem "pseudoprimären Aldosteronismus" nach JAHNECKE
3. Den unbestimmten Hyperaldosteronismus (IndHA)
4. Den Glucocorticoid-therapierbaren Hyperaldosteronismus (GRHA).

Die Differentialdiagnose zwischen einem echten Conn-Syndrom (APA) und einem idiopathischen Hyperaldosteronismus, dessen morphologisches Äquivalent eine bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie darstellt (HORTON, 1973), ist von erheblicher Bedeutung, da eine subtotale oder totale Adrenalectomie bei der Hyperplasie im Gegensatz zum Adenom in den meisten Fällen nicht zur Besserung der Hypertonie führt (LARAGH, 1967; DAVIS, 1967; KATZ, 1967; CONN, 1961).

BIGLIERI (1972) und AITCHISON (1971) beschreiben Versuche, eine Differentialdiagnose durch mehrdimensionale Analyse multipler klinischer und biochemischer Daten herbeizuführen. Diese Methoden dürften jedoch für die breite klinische Anwendung zu aufwendig sein.

Erst vor kurzem ergaben sich durch die Bestimmung des Plasmaaldosterons drei mögliche Lösungen dieses diagnostischen Problems:

1. Durch seitengetrennte Bestimmung des Plasmaaldosterons im Nebennierenvenenblut nach retrograder Katheterisierung läßt sich einerseits eine sichere Seitenlokalisation eines Adenoms und andererseits auch die Frage bilaterale Hyperplasie oder nicht relativ sicher beantworten (MELBY et al., 1967; HORTON, 1972; SCOGGINS et al., 1972).
2. LUETSCHER et al. berichteten 1973 über Ergebnisse wonach Patienten mit IHA nach vierstündiger Orthostase einen deutlichen Anstieg des Plasmaaldosterons zeigen, der bei Patienten mit aldosteronproduzierendem Adenom ausblieb. In den meisten Fällen zeigten die Adenompatienten auf Orthostasereiz sogar einen Abfall der Plasma-Aldosteron-Konzentration (GANGULY et al., 1973, 1,2).
BIGLIERI konnte diese Ergebnisse bestätigen (1974).
3. Darüber hinaus beobachteten BIGLIERI und SCHAMBELAN (1973, 1974), daß der Plasmaaldosteron-Spiegel bei APA und IHA-Patienten nach Applikation des Aldosteronantagonisten Spironolacton in unterschiedlicher Weise reagiert: Während der Plasmaaldosteron-Spiegel bei Aldosteronompatienten nach Spironolactongabe abfällt, nimmt er bei Patienten mit bilateraler Hyperplasie zu.

Bei Vorliegen eines Verdachtes auf primären Aldosteronismus wird in unserer Klinik neben den röntgenologischen und szintigraphischen Verfahren folgendes Vorgehen empfohlen (LOMMER, 1974):

1. Aldosteronanalyse im Urin (ER oder SR) oder im Plasma:

Bei Nachweis eines Hyperaldosteronismus anschließend Ursachenklärung. Zu beachten ist, daß normale Aldosteronwerte einen PA noch nicht grundsätzlich ausschließen (BROWN et al., 1968; BIGLIERI et al., 1967).

2. Bestimmung der Plasmareninaktivität in Ruhe und nach Stimulation durch

Orthostase, Na -Entzug oder Diuretika.

Bei Nachweis einer Hyporeninämie oder Ausbleiben des Reninanstieges nach Stimulation erfolgt Einordnung in die Kategorie "primärer Aldosteronismus", bei Hyperreninämie und regelrechtem Ansprechen auf Stimulation Klassifizierung als "sekundärer Aldosteronismus" (sA). Das Ruhe-Renin allein ist zur Differenzierung zwischen pA und sA nicht geeignet, da auch bei Patienten mit pA Ruhereninwerte im Normbereich festgestellt wurden (BROWN et al., 1968).

3. Mineralcorticoid-Suppressionstest nach BIGLIERI (1967) zur Sicherung eines primären Aldosteronismus:

Durch Applikation von 11-DOCA i.m. (BIGLIERI, 1967) oder 9-alpha-Fluorocortisol peroral (HORTON, 1969, 1973) wird die Reninfreisetzung gehemmt. Im Normalfall und bei Vorliegen eines sekundären Aldosteronismus kommt es dadurch zu einer Einschränkung der Aldosteron-Sekretion. Beim pA dagegen ist die Reninfreisetzung bereits supprimiert. Die Aldosteron-Sekretion bleibt auch während des Mineralcorticoidsuppressionstests unverändert hoch oder steigt sogar an: Der BIGLIERI-Test ist daher negativ.

Aldosteron kann bei diesem Test entweder als ER (BIGLIERI, 1967) oder durch die Aldosteron-Plasma-Konzentration (HORTON, 1969) bestimmt werden.

Generell kann man sagen, daß Stimuli, die über das RAA-System wirksam werden, wie z.B. NaCl-Infusionen, bei Vorliegen eines pA (HORTON, 1973) ineffektiv in der Kontrolle der Aldosteron-Sekretion sind.

4. Differentialdiagnose zwischen Adenom und Hyperplasie durch

- a) Bestimmung der Plasma-Aldosteron-Konzentration in Ruhe und nach Orthostase.
- b) Bestimmung der Plasma-Aldosteron-Konzentration nach Spironolactonbehandlung.

5. Bei Nachweis eines Adenoms: Seitenlokalisation durch seitengetrennte Bestimmung des Nebennierenvenenaldosterons.

4.2. Sekundärer Hyperaldosteronismus

Ein sekundärer Hyperaldosteronismus mit Hyperreninämie ist häufiges Begleitsymptom bei Hochdruckleiden, insbesondere der renovaskulären Hypertonie, der maligne verlaufenden Hypertonie und der akzeleriert verlaufenden essentiellen Hypertonie (JAHNECKE, 1974). Der gemeinsame pathogenetische Mechanismus des Hyperaldosteronismus ist in allen diesen Fällen eine Aktivierung des RAA-Systems aufgrund einer renalen Minderdurchblutung, deren direkte Ursache eine ein- oder doppelseitige Nierenarterienstenose (NAS), eine Arteriolsklerose oder Arteriolonekrose sein kann. An der Pathogenese der Hypertonie selbst ist der Hyperaldosteronismus nicht beteiligt (JAHNECKE, 1974).

Chronische Saluretikatherapie bei Hypertonie und chronischer Laxantiengebrauch sind in der Praxis häufig vorkommende Ursachen eines sekundären Hyperaldosteronismus. Pathogenetisch auslösend wirkt in diesen Fällen die primäre Verminderung des Na^+ -Bestandes und die Verkleinerung des Extrazellulärspaces. Die häufig unter Saluretika- oder Laxantientherapie auftretenden Hypokaliämien sind nicht nur Folge einer direkten kaliuretischen Tubuluswirkung, sondern auch Folge des durch die Na^+ -Verarmung induzierten sekundären Hyperaldosteronismus (JAHNECKE, 1974).

Untersuchungen über die Rolle des Plasmaaldosterons bei Herz-, Leber- und Nierenerkrankungen, die mit Ödemen einhergehen, finden sich bei WOLFF (1965, 1962, 1965) und LOMMER (1968).

Zur Beurteilung der Erfolgsaussichten der chirurgischen Therapie eines sekundären Hyperaldosteronismus mit Hyperreninämie ist die differentialdiagnostische Abgrenzung der NAS notwendig. Hierzu eignet sich am besten die seitengetrennte Bestimmung der Reninaktivität im Nebennierenvenenblut.

Auf die diagnostischen Probleme des "pseudoprimären Aldosteronismus", der aufgrund der begleitenden Reninsuppression klinisch und biochemisch die gleiche Symptomatik wie ein CONN-Syndrom bietet, und daher nach BIGLIERI (1972, 1974) und LOMMER (1974) zu den Formen des primären Aldosteronismus gezählt wird, wurde bereits eingegangen. Die Ursache der Hyperplasie ist nach wie vor ungeklärt, doch spricht das bilaterale Auftreten für die chronische Einwirkung eines extraadrenalen corticotropen Stimulus, der nicht mit dem Renin identisch sein kann (JAHNECKE, 1974).

4.3. "Low-Renin-Hypertension" - Essentielle Hypertonie mit Reninsuppression

Ein Kernproblem in der gegenwärtigen Diskussion über die Pathogenese der essentiellen Hypertonie stellt eine Gruppe von etwa 20 % der essentiellen Hypertoniker dar (JOHNSTON, 1967; DISTLER, 1974), bei denen sich ein erniedrigter Reninspiegel bei normalem Aldosteronspiegel findet (LEDINGHAM et al., 1967; CHANNICK et al., 1969; JOSE et al., 1969; LARAGH, 1972; SPARK, 1971; DISTLER, 1974). Es wird diskutiert, daß ein noch nicht sicher bekanntes Mineralcorticoid als Ursache dieser essentiellen Hypertonie eine Rolle spielt (HORTON, 1973; MELBY, 1971, 1972; SPARK, 1972; WOODS et al., 1969). LIDDLE (1974) berichtete vor kurzem, 16- β -hydroxydehydroepiandrosteron (16- β -OH-DHEA) sei das gesuchte Mineralcorticoid. MELBY et al. (1974) dagegen konnten 16- α -18-Dihydroxydeoxycorticosteron (16- α -18-Di-OH-DOC) bei zwei Patienten als Ursache der Reninsuppression wahrscheinlich machen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein Bericht von VECSEI (1973), der ein bisher nicht identifiziertes Corticosteroid an Hand seiner starken Affinität zu Aldosteron-Antikörpern im Radioimmunoassay charakterisierte.

5. DIE ANALYSE DES PLASMAALDOSTERONS UND IHRE KLINISCHE BEDEUTUNG

Die radioimmunologische Technik bedeutet eine wesentliche Vereinfachung und Verfeinerung der Aldosteronanalyse. Dennoch bleibt der Aufwand in Klinik und Laboratorium beträchtlich, so daß Aldosteronanalysen nur dann gerechtfertigt sind, wenn aus den diagnostischen Erkenntnissen therapeutische Konsequenzen zu erwarten sind. Die Bestimmung des Plasmaaldosterons steht ergänzend neben den bisher üblichen Urinanalysen, Exkretionsrate und Sekretionsrate und ist nur bei bestimmten Fragestellungen als Methode der Wahl vorzuziehen.

Die wesentlichen Vorteile der Plasmaanalyse gegenüber der Urinanalyse sind:

1. Ihre Aussagekraft über die *a k u t e* Physiologie. Die Beobachtung von Reaktionen auf *akute* Stimuli wird möglich.
2. Keine Gefahr der Mißinterpretation bei Leber- und Nierenerkrankungen, wie sie bei Urinanalysen vorkommen können (WOLFF, 1963).
3. Einfache Probengewinnung. Keine Sammelfehler wie beim 24-h-Urin sind mehr möglich.

Auf eine strenge Standardisierung der klinischen Bedingungen kann auch bei der Plasmaaldosteron-Analyse nicht verzichtet werden.

Die Anwendungsbereiche der Plasmaaldosteronbestimmung sind nachfolgend nochmals tabellarisch dargestellt. Auf ihre Bedeutung wurde größtenteils in den vorangehenden Abschnitten bereits eingegangen.

Tabelle 2

Anwendungsmöglichkeiten der Plasmaaldosteron-Analyse

<u>Diagnostisches Problem</u>	
1. Feststellung eines Hyperaldosteronismus	Ruhe- und Orthostaseplasmaaldosteron
2. Screening-Test nach APA (HORTON, 1970) (Funktionsprüfung des RAA-Systems)	Plasmaaldosteron im a) Suppressionstest unter NaCl-Infusion b) Stimulationstest unter Angiotensin-Infusion
3. Sicherung eines primären Aldosteronismus	Mineralcorticoidsuppressionstest nach BIGLIERI (1967) in der Modifikation von HORTON (1973)
4. Differentialdiagnose zwischen Aldosteronom und bilateraler Nebennierenrindenhyperplasie	a) Orthostasestimulationstest nach LUETSCHER/BIGLIERI (1973) b) Spironolactontest nach BIGLIERI (1973)
5. Seitenlokalisation eines Aldosteronoms	Seitengetrennte Nebennierenvenenblutanalyse
6. Tagesprofilstudien	nach KEM et al. (1973)

Die vorliegenden Hypothesen über die mögliche Bedeutung der Mineralcorticoide für die essentielle Hypertonie (BÜHLER et al., 1973; HELBER, 1974) lassen einen Radioimmunoassay für Plasmaaldosteron darüber hinaus als geeignetes Hilfsmittel für die Forschung in diesem Bereich erscheinen.

6. THEORIE DER SÄTTIGUNGSANALYSE

6.1. Einleitung

Der Radioimmunoassay ist eine mikroanalytische Methode von hoher Sensitivität und Spezifität. Er basiert auf dem allgemeinen Prinzip der "Sättigungsanalyse" ("saturation analysis"). MURPHY definiert diesen übergeordneten Begriff als "Assay, der auf dem Wettbewerb zweier Formen desselben Moleküls um die Reaktionsstellen eines zweiten Moleküls geringerer Konzentration beruht" und gibt zugleich eine gute Übersicht der derzeit üblichen Terminologie (MURPHY, 1970).

Die Vorteile der radioimmunologischen und anderer "Radio-ligand"-Techniken sind:

1. die einzigartige Spezifität biochemischer und im besonderen immunologischer Reaktionen
2. die große Empfindlichkeit von Radioaktivitätsmessungen.

6.2. Grundprinzip

Das Grundprinzip des RIA besteht in einer Wettbewerbsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt.

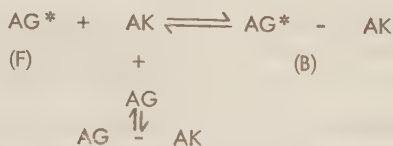


Abb. 1: Competitive Antigen-Antikörper-Reaktionen die dem Radioimmunoassay zugrunde liegen.

Unmarkiertes Antigen (AG) in den zu untersuchenden Proben konkurriert mit radioaktiv markiertem AG^* , dem "Tracer", um die Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers (AK) und vermindert somit die Bindung des radioaktiven Antigens an den AK. Das Ausmaß dieser kompetitiven Bindungshemmung in den Proben wird mit der Hemmung durch bekannte Standards¹ desselben Antigens verglichen (YALOW & BERSON, 1969).

¹ Als Standard wird eine durch Einwaage hergestellte Lösung der Reinsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel bezeichnet.

Ein Radioimmunoassay wurde erstmals von BERSON und YALOW (BERSON, 1957; BERSON & YALOW, 1958; YALOW & BERSON, 1960) für die Bestimmung von Insulin im Plasma beschrieben. Inzwischen wurde die Anwendung dieses Prinzips auf nahezu alle Peptid- und Proteohormone ausgedehnt (BERSON et al., 1964). Durch Koppelung an hochmolekulare Proteine gelang es auch für primär nicht immunogene Substanzgruppen wie Steroide und Pharmaka Antikörper mit hoher Affinitätskonstante zu produzieren, welche spezifisch mit dem niedermolekularen Hapten reagieren (LIEBERMAN, 1959; THORNEYCROFT, 1970; GOODFRIEND, 1970). Damit war eine wichtige Voraussetzung dafür gegeben, auch Steroide durch einen RIA zu messen.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß sich die Anwendung von RIAs keinesfalls auf Hormone beschränken muß. Auch braucht die spezifische Reaktion nicht notwendigerweise eine Immunreaktion zu sein. Man würde in diesem Fall allgemeiner von einem "competitiven Radioassay" (BERSON & YALOW, 1970), einer "Radio-Ligand-Technik", einer "Proteinbindungstechnik" (MURPHY, 1969, 1970) oder in der Terminologie von EKINS von "Sättigungsanalyse" sprechen (EKINS, 1970). Die Grundreaktion in allgemeiner Form stellt sich also wie folgt dar (Abb. 2):

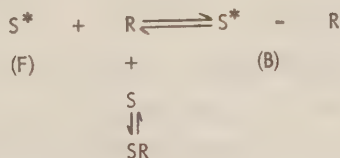


Abb. 2: Allgemeine Grundreaktion der Sättigungsanalyse mit einem Substrat S und einem spezifischen Reaktionspartner R

Hieraus ergeben sich die drei Grundvoraussetzungen für die Erstellung einer Proteinbindungstechnik bzw. eines Radioimmunoassays im Sonderfall.

1. Als Substrat P fungieren kann jede Substanz, für die
2. ein spezifischer Reaktionspartner Q zur Verfügung steht, und die
3. auch in markierter Form, als "Tracer", verfügbar ist.

6.3. Anforderungen an den spezifischen Reaktionspartner Q (EKINS, 1970)

Der Reaktionspartner Q muß

a) spezifisch mit P reagieren

b) absättigbar ("saturable") sein, d.h. er muß in einer Konzentration vorliegen, welche die Menge von P, die mit Q reagieren kann, auf etwa diejenige Menge limitiert, die der Gesamtmenge von P im System entspricht.

c) eine hohe Affinität zu P besitzen, d.h. die Gleichgewichtskonstante als Maß der Reaktionsenergie für die Reaktion zwischen P und Q muß um so größer sein, je niedriger die Konzentration von P ist, welche gemessen werden soll. Nur dadurch ist ein Nebeneinanderbestehen von größeren Mengen freien P und zugleich ungesättigten Bindungsstellen von Q unmöglich.

Als spezifische Reaktionspartner Q wurden bisher folgende Substanzklassen verwendet (MIDGLEY, 1970): Plasma-Proteine, spezifische Gewebsproteine, Antikörper und neuerdings auch Enzyme und DNS (YALOW & BERSON, 1970; UPSPRUNG, 1968; MURPHY, 1970).

Die folgende Übersicht stellt die wichtigsten Vor- und Nachteile verschiedener Assayproteine dar.

Tabelle 3

In Anlehnung an MURPHY, 1970

Substanzklasse	Plasma-Proteine	Gewebsproteine	Antikörper
Vorteile:	hohe Assoziationskonstante: $10^7 - 10^{10}$ l/mol hohe Spezifität Spezifität mit großer Korrelation zur biologischen Aktivität konstante Spezifität innerhalb der Spezies sehr gut lagerungsfähig schnelle Präparation durch Ver- dünnung	hohe Assoziations- konstante höhere Spezifität sehr große Korrelation der Spezifität zur bio- logischen Aktivität konstante Spezifität innerhalb der Spezies	hohe Assoziations- konstante höchste Spezifität für alle Substanzen brauchbar sehr stabil sehr hohe Titer

Substanzklasse	Plasma-Proteine	Gewebsproteine	Antikörper
Nachteile:	Beschränkung auf wenige physiologische Substanzen	Beschränkung auf wenige physiologische Substanzen instabil, schlecht lagerungsfähig schwierige Präparierung durch Zellfraktionierung	gelegentlich keine Korrelation zur biologischen Aktivität variable Spezifität langwierige Präparierung durch Immunisierung
neutrale Merkmale:	niedriger Titer	niedriger Titer	

Für Steroidassays hat sich die Verwendung von Antisera in vielen Fällen als vorteilhaft erwiesen. Zur Erstellung eines Aldosteron-Assays stehen lediglich zwei potentielle Assayproteine zur Auswahl: spezifische Gewebsproteine und Aldosteron-Antikörper. Ein spezifisches Plasma-Protein für Aldosteron existiert nicht.

6.4. Anforderung an den "Tracer" P^* (BERSON & YALOW, 1968)

Aus theoretischen Überlegungen über die Kinetik des RIAs ergibt sich,

1. daß zur Maximierung der Sensitivität¹ eines Assays die eingesetzte Menge an "Tracer" möglichst gering gehalten werden soll. Da andererseits die untere Grenze der einzusetzenden Konzentration an "Tracer" durch die in praxi notwendige Begrenzung der Zählzeit, die ihrerseits wieder die Präzision beeinflusst, vorgegeben ist, empfiehlt sich

¹ Der Begriff Sensitivität wird von verschiedenen Autoren in unterschiedlicher Definition gebraucht:

1. Als quantitatives Maß für die Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurve.
2. Als die minimal meßbare Menge ("minimum detectable quantity") – das ist diejenige Menge P , die mit 95 % Sicherheit von der Menge O unterschieden werden kann.

EKINS (1970) weist nach, daß die erstgenannte Definition nur in einigen Sonderfällen eine zuverlässige Beschreibung der Sensitivität ermöglicht. Wir gebrauchen deshalb den Begriff Sensitivität im Sinne der zweiten, eindeutigen, Definition.

2. die Verwendung von Tracern hoher spezifischer Aktivität. Die hochmarkierten Tracer haben aber zwei wesentliche Nachteile: Je höher die Markierung einer Substanz, um so geringer ist in der Regel ihre Stabilität und darüber hinaus kommt es insbesondere durch ^{125}J -Markierung zu einem Verlust an spezifischer Reaktivität, so daß die Grundbedingung $k_{\text{Tracer}} = k_{\text{Testsubstanz}}$ nicht mehr erfüllt ist (k = Gleichgewichtskonstante der spezifischen Reaktion). Es ergeben sich somit zwei weitere Anforderungen:
3. Es sollten nur Tracer verwendet werden, die ausreichend stabil sind und deren Homogenität nachgewiesen ist. Diese läßt sich bei Peptiden elektrophoretisch und bei Steroiden chromatographisch überprüfen.
4. Der im RIA verwendete "Tracer" sollte nur gerade so hoch markiert sein, daß kein nennenswerter Verlust an spezifischer Immunreaktivität eintritt. Sichere Voraussagen lassen sich auch für dieses Kriterium nicht machen. Es ist deshalb im Einzelfall gesondert zu überprüfen.

Im Falle der Proteohormone ist die Verwendung von ^{125}J markierten Tracern am gebräuchlichsten. Dies geschieht entweder durch Markierung von Tyrosinmolekülen im Hormon selbst oder durch Ankoppelung von ^{125}J -Tyrosin-haltigen Peptidresten.

Zur Radiomarkierung von Steroiden wird in der Regel ^3H verwendet (MIDGLEY, 1970). Die spezifische Aktivität läßt sich unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen durch eine zunehmende Anzahl von radioaktiven Substituenten im Molekül steigern. ^{14}C Markierung kommt wegen der zu geringen spezifischen Aktivität nicht in Frage.

In letzter Zeit wurden auch Versuche beschrieben, die die Vorteile der ^{125}J -Markierung gegenüber der Tritium-Markierung im Hinblick auf Sensitivität und Präzision auch für Steroidassays nutzbringend einsetzen (EDWARDS, 1974).

6.5. Ablauf einer "Sättigungsanalyse" im Allgemeinen und eines RIAs im Besonderen (Abb. 3)

Bezeichnet man die zu messende Substanz mit P bzw. AG, den spezifischen Reaktionspartner mit Q bzw. AK und den Tracer mit P^* bzw. AG^* , so läßt sich der Ablauf eines Assays schematisch wie folgt beschreiben:

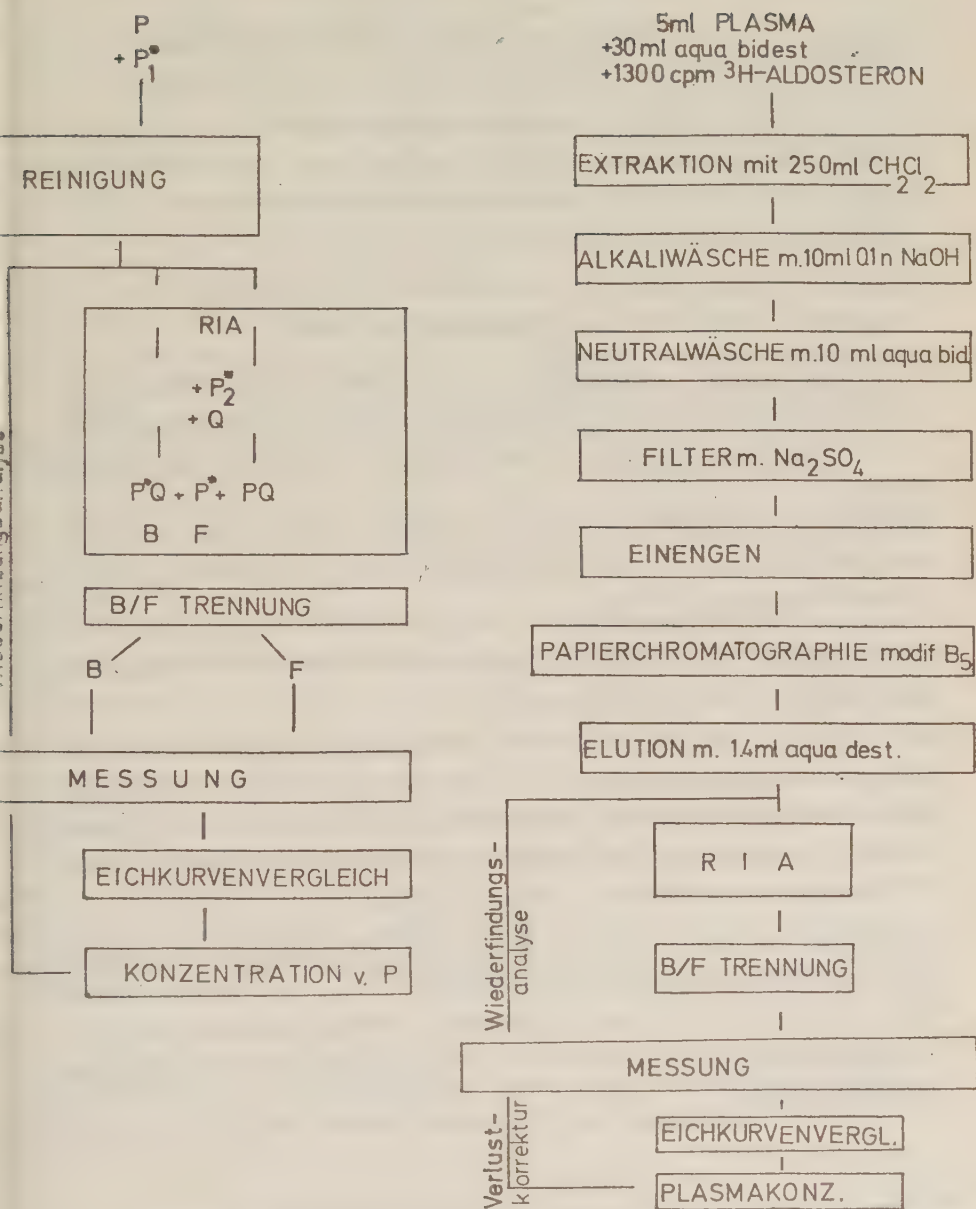


Abb. 3 : Ablauf einer Sättigungsanalyse im Allgemeinen und Fluß-diagramm des vorliegenden Aldosteron-Radioimmunoassays

1. Zunächst wird eine definierte Menge – z.B. 500 cpm – radioaktiven $P^*(AG^*)$ als Verlustindikator (Recovery-Analyse) den Proben zugesetzt und anschließend gemischt.
2. Falls die Spezifität von Q (AK) – wie bei den Steroiden meist der Fall – nicht ausreicht um P (AG) direkt im unveränderten biologischen Medium zu messen, wird P (AG) eventuell zusammen mit ähnlichen Substanzen extrahiert und ~~anschließend~~ gegebenenfalls durch chromatographische Reinigung weiter isoliert.
3. Mit Hilfe des zu Beginn zugesetzten Verlustindikators wird die Wiederfindung von P ("Recovery") in einem Teilvolumen der gereinigten Probe bestimmt.
4. Zwei weitere Teilvolumina der gereinigten Probe mit der Substanz P (AG) werden dem eigentlichen Assay zugeführt: Sie werden mit Q (AK) und einer definierten Menge $P^*(AG^*)$ – die erheblich größer als die Menge des Verlustindikators ist – unter definierten Bedingungen incubiert.
Bei Einhaltung der richtigen Konzentrationen von $P^*(AG^*)$, P (AG) und Q (AK) ist das Verhältnis von gebundenem P^* , als P^*Q , zu ungebundenem $P^*(AG^*)$ sensitiv abhängig von der vorhandenen Gesamtmenge an P (AG).
5. Die gebundenen Anteile " B " = $PQ + P^*Q$ werden durch ein geeignetes Verfahren von den freien Anteilen " F " = P^* ¹ getrennt.
6. Die Messung der Aktivität von " B " oder " F ", oder von beiden, in einem Szintillationszähler ermöglicht einen direkten Rückschluß auf die vorliegenden Konzentrationen beider Anteile. Aus dem Vergleich des Verhältnisses von B/F oder von $B/B + F$ mit dem gleichzeitig gemessener Standards, in denen die eingesetzte Menge P (AG) bekannt ist, auf einer Eichkurve, ergibt sich die gesuchte Menge P (AG).
7. Die Kalkulation der Menge P erfolgt entweder graphisch an Hand der Eichkurve oder rechnerisch nach Transformation oder Approximation der Eichkurve. Die Transformation der Eichkurve hat den Vorteil, daß die Auswertung dann mit Hilfe eines Computers wesentlich vereinfacht werden kann (SINTERHAUFF et al., 1974; RODBARD, 1970, 1974; MARSCHNER, 1974; EKINS, 1972).

¹ " F " besteht im Idealfall nur aus freiem Tracer, denn die Testsubstanz sollte vollständig gebunden sein.

6.6. Die Produktion von Antiseren (KELLIE, 1972; YALOW & BERSON, 1970; HURN, 1971)

In dem vorangehenden Abschnitt über den spezifischen Reaktionspartner habe ich bereits darauf verwiesen, daß Steroidassays in der Mehrzahl mit spezifischen Antikörpern ausgeführt werden, so daß ich hier nur auf die Produktion spezifischer Antikörper näher einzugehen brauche. Zunächst ist eine Präparation des AGs herzustellen, welches man später im Assay bestimmen möchte. Die Art der AG-Präparation hängt von der Substanz ab: Während Proteo- und Peptidhormone meistens in unveränderter Form zur Immunisierung verwendet werden können, ist die Immunisierung gegen kleinere Moleküle, wie Steroide, nur durch Bildung von Protein-Konjugaten möglich, in denen das kleinere Molekül als Hapten fungiert. Die Präparation von Steroid-Protein-Konjugaten erfolgt nach der Beschreibung von LIEBERMAN u. Mitarb. (ERLANGER, 1957; LIEBERMAN, 1959): Das Steroid wird durch Substitution einer oder mehrerer OH- oder Ketogruppen am Cyclopentanoperhydrophenanthrengerüst in ein Hemisuccinat, Disuccinat, Karbonsäuresalz oder Oxim übergeführt. Im Hinblick auf eine optimale Spezifität des zu produzierenden AKs ist es vorteilhaft, die Derivatbildung am Steroidgerüst in solchen Positionen vorzunehmen, die möglichst weit von der spezifischen Gruppe des Haptens entfernt sind (IEFFCOATE, 1971).

Das Steroid-Derivat wird anschließend an ein Rinder- oder Kaninchenalbumin gekoppelt, wobei das Steroid/Protein-Verhältnis über 20 liegen sollte (MIDGLEY, 1969, 1970). Das Steroid-Protein Konjugat wird dann in einer Emulsion mit Freund's Adjuvans wiederholt einem Tier - z.B. Schaf oder Kaninchen - injiziert. Nach einigen Monaten wird das Tier dann zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet.

Auch bei gleichem Immunisierungsschema mit derselben AG-Präparation entwickeln Tiere ein und derselben Spezies Antikörper, die sich hinsichtlich des Titer¹ (Konzentration), der Avidität (Gleichgewichtskonstanten) und ihrer Spezifität beträchtlich voneinander unterscheiden. Die Reinheit des zur Immunisierung verwendeten AGs ist von relativ untergeordneter Bedeutung - verglichen etwa mit den Reinheitsanforderungen an den Tracer oder den Hormonstandard im Assay.

¹ "Der Titer" kennzeichnet diejenige Antiserumverdünnung, bei welcher 50 % des Tracers gebunden ist, wenn die Tracer-Konzentration selbst 20 pg/ml nicht überschreitet.

YALOW und BERSON (1970) fanden keinen signifikanten Unterschied der Sensitivität und des Titers beim Vergleich von Antiseren die durch Immunisierung mit gereinigtem respektive ungereinigtem Parathyreoidea-Hormon hergestellt wurden.

Eine Übersicht verschiedener Immunisierungstechniken geben LADER et al. (1974).

Speziell über die Herstellung von Aldosteron-Antikörpern berichten AFRICA und HABER (1971), VETTER et al., 1974 und VECSEI et al., 1973.

Ein Vergleich der zur Produktion von Aldosteron-Antikörpern verwendeten Antigenpräparationen und Tierspezies sowie der erzielten Titer und Spezifitäten findet sich in der Literaturübersicht im 2. Kapitel (Tab. 1).

6.7 Auswahl eines geeigneten Antiserums (YALOW & BERSON, 1970).

Antiseren weisen auch bei gleicher Immunisierungstechnik eine große Variation in Konzentration, AG-Affinität und Spezifität auf. Verschiedene Antiseren gegen ein gegebenes AG sind somit keineswegs gleich wertvoll.

Im Abschnitt 6.3 habe ich die Anforderungen zur Optimierung dieser drei Kriterien dargelegt. Die Auswahl eines geeigneten Antiserums muß diesen allgemeinen Anforderungen Rechnung tragen.

Je geringer die ins Auge gefaßte Hormonkonzentration ist, welche gemessen werden soll, um so größer muß die Avidität des Antiserums gegenüber dem Antigen sein. Im Falle des Plasmaaldosterons ist also eine hohe Sensitivität, d.h. mit der unter 6.4 genannten Einschränkung eine im unteren Dosisbereich steile Eichkurve, das Hauptauswahlkriterium (BERSON & YALOW, 1968).

Unter anderen Umständen, etwa zur Messung hoher Hormonkonzentrationen aus Gewebsextrakten, tritt die Präzision als primäres Auswahlkriterium an die Stelle der Sensitivität. Sensitivität und Präzision sind somit unter Umständen alternative Kriterien. BERSON und YALOW zeigen in einer mathematischen Analyse des RIA (1970), daß die maximale Sensitivität eines Assays eine Funktion der Gleichgewichtskonstanten der Grundreaktion ist, und somit von der Avidität des jeweiligen Antikörpers zu seinem Hapten bestimmt wird.

Dagegen ist die maximale Präzision theoretisch eine Konstante, welche für alle AK gleichermaßen gilt.

Es sei jedoch schon hier darauf hingewiesen, daß die Assay-Merkmale Sensitivität, Präzision und Spezifität nicht allein von der Auswahl des AKs und AK-Titers abhängig sind. Weitere Parameter, welche diese Qualitätsmerkmale des Assays beeinflussen, werden bei der Besprechung der Zuverlässigkeitskriterien diskutiert.

Die Antiserumauswahl vollzieht sich entsprechend der Zahl der Kriterien in drei Schritten:

1. Vorauswahl: Bestimmung des optimalen Antiserumtiters für jedes Antiserum: Es werden Verdünnungsreihen der zu testenden Antiseren angelegt (z.B. Titer 1:1 000 - 1:500 000) und im Assay mit Tracer in Abwesenheit unmarkierten Hormons die jeweiligen B/F_0 Quotienten oder die $\% B_0 = B_0 / B + F$ Werte bestimmt. Trägt man die Ergebnisse dieser Messungen in ein Koordinatensystem mit den Koordinaten $x = \text{Antiserumverdünnung}$ und $y = \% B$ oder $y = B/F$ ein, so erhält man Antiserumverdünnungskurven wie in Abb. 12. Für das weitere Vorgehen werden diejenigen Titer eines jeden Antiserums verwendet, die gerade eine Hemmung von $B/F = 1$ entsprechend $\% B = 50$ ergeben.
2. Auswahl des sensitivsten Antiserums: Von jedem Antiserum wird nun mit dem zuvor bestimmten "Titer" eine Eichkurve mit verschiedenen Konzentrationen unmarkierten Hormons erstellt. Das Antiserum, welches die sensitivste Eichkurve ergibt, wird dann für den Assay verwendet.
3. Bestimmung der Spezifität des Antiserums: Für jedes in Frage kommende Antiserum ist das Ausmaß der Kreuzreaktivität nach der von ABRAHAM (1969) beschriebenen Methode zu bestimmen.

Obwohl theoretische Überlegungen zur Optimierung der Sensitivität die Auswahl desjenigen AK-Titers, der einen B/F -Quotienten von 0,5 - gleichbedeutend mit einem $\% B$ von 33 - ergibt, nahelegen, bevorzugt man in praxi eine Antiserumverdünnung zwischen 33 und 50 $\% B$, da die resultierenden Eichkurven präzise Messungen über einen größeren Bereich erlauben. Die Auswahl eines geeigneten Antiserums sollte wie der Assay selbst unter Verwendung möglichst geringer Tracermengen erfolgen. Zu hohe Tracer-Konzentrationen können die Entdeckung guter Antiseren verhindern, da in einer inhomogenen Antikörperpopulation, diejenigen mit hohen Affinitätskonstante aber geringen Konzentrationen, rasch abgesättigt werden. Dadurch kommt es zu einer Benachteiligung der Antiseren mit hoher Gleichgewichtskonstante.

Die Homogenität eines Antiserums läßt sich durch vergleichende Untersuchungen der Spezifität bei verschiedenen Verdünnungen überprüfen: auffallende Spezifitätsunterschiede sprechen für eine Heterogenität des AKs (BERSON & YALOW, 1968).

6.8. Die Trennung von gebundenem "B" und freiem "F" Antigen

Bisher war nur von den im ersten Abschnitt genannten Grundvoraussetzungen, welche die Reaktionspartner selbst betreffen, die Rede. Bei der Skizzierung des Ablaufes eines RIAs wurde darüber hinaus auf die Notwendigkeit einer geeigneten Technik zur Trennung von gebundenem und freiem AG als weitere Voraussetzung für die Erstellung eines RIAs hingewiesen.

In der Praxis muß die Auswahl eines geeigneten Trennungsverfahrens für "B" und "F" bereits vor der Auswahl des Antiserums erfolgen, da diese ja bereits eine funktionierende Separationstechnik voraussetzt. Bei der Prüfung verschiedener Separationstechniken sind neben der Praktikabilität folgende Anforderungen zu beachten (EKINS, 1970; HUNTER, 1971):

1. Die Separationstechnik soll eine sofortige und möglichst vollkommene Trennung von B und F gewährleisten.
2. Assoziations- und Dissoziationsreaktionen zwischen P und Q sollen zugleich gestoppt werden.
3. Die Effizienz der Trennung sollte von anderen Bestandteilen des Inkubationsmediums - z.B. Eiweiß - nicht wesentlich beeinflusst werden.

Die erste und zweite Bedingung werden in praxi von keiner Technik voll erfüllt, woraus immer ein gewisser Verlust an Präzision und Sensitivität resultiert, besonders in Fällen, in denen die Dissoziationsrate von PQ hoch ist, wie bei manchen Steroid-Protein-Komplexen. Die Proteinkonzentration im Inkubationsmedium beeinflusst z.B. die Adsorptionseigenschaften von Aktivkohle sehr wesentlich (BINOUX, 1972). Ein Verlust an Spezifität tritt jedoch nicht ein, wenn für gleiche Proteinkonzentration in Proben und Eichkurvenansätzen gesorgt wird. Gleichmaßen wie Eiweiß können Verunreinigungen in den Eluaten der Papierchromatographie das Adsorptionsverhalten beeinflussen und unspezifische Effekte ergeben.

Da eine spontane Präzipitation der AG-AK-Komplexe unter den üblichen Bedingungen nicht vorkommt, wurden zahlreiche Separationstechniken entwickelt, deren Anwendbarkeit von Fall zu Fall zu prüfen ist.

A) Methoden bei denen der Anteil des freien AGs gemessen wird:

1. Die Doppel-AK-Technik: Die gebildeten AG-AK-Komplexe werden durch einen zweiten Antikörper AK_2 , welcher gegen das Gamma-Globulin des ersten Antikörpers gerichtet ist, präzipitiert (JOEL, 1974).
2. Proteinpräzipitation mit gesättigtem, kaltem Ammoniumsulfat, wenn sich die Löslichkeit des AGs wesentlich von derjenigen des AG-AK-Komplexes unterscheidet (MAYES, 1970; MARTIN, 1973; BARTORELLI, 1973; GOMEZ-SANCHEZ, 1973).
3. Festkörpertechniken ("solid-phase-techniques"), die auf der Verwendung eines polymeren Trägermoleküls basieren, an welches der spezifische Antikörper unspezifisch gebunden wird (CATT, 1967_{1,2}). Ihr Vorteil besteht in der Einfachheit, Schnelligkeit, Sensitivität und großen Probenkapazität. Nach der Art der Bindung an das Trägermolekül unterscheidet man:
 - 3.1. Techniken, die einen covalent - i.e. chemisch - an ein unlösliches Polymer ("Radioimmunosorbent") gebundenen AK verwenden. Als Radioimmunosorbent fanden Verwendung:

Polystyrol, Polytetrafluoroäthylen-g-isothiocyanatostyrol (CATT, 1967) oder Sephadex-isothiocyanat (WIDE, 1967) in Pulver oder Scheibenform.
 - 3.2. Techniken mit antikörperbeschichteten Gefäßen:

Dabei werden AK physikalisch an die Wand von Polypropylen- oder Polystyren-Gefäßen adsorbiert. Die Assaygefäße können dann zugleich als Meßgefäße im Counter Verwendung finden (CATT, 1967).
4. Direkte Extraktion des freien Hormons mit Toluolszintillator (BANKS, 1971; EKINS, 1972).

B) Methoden bei denen der Anteil des gebundenen Antigens gemessen wird:

1. Adsorption des freien AGs an

- Cellulose (YALOW & BERSON, 1970)
- Aktivkohle (BINOUX, 1972; NUGENT, 1966; HERBERT, 1964; ZALUSKY, 1968)
- Silikate: "Florisil" (MURPHY, 1970; ITO, 1972; BAYARD, 1970)
- Talkum (YALOW & BERSON, 1970)
- Harze: "Amberlite" (YALOW & BERSON, 1970).

wobei der AG-AK-Komplex in Lösung bleibt. Das Adsorbens wird mitsamt dem adsorbierten freien AG abzentrifugiert und der Überstand für die Messung dekantiert. Über den Adsorptions-

mechanismus selbst läßt sich noch wenig Definitives sagen. Untersuchungen hierüber finden sich ebenfalls bei BERSON & YALOW (1970).

Darüber hinaus sind in der Literatur noch eine Reihe weiterer Techniken beschrieben, die aber für Steroidassays keine wesentliche Rolle spielen.

Je nach Art der Separationstechnik werden entweder das freie AG "F", das gebundene AG "B" oder beide gemessen. RODBARD (1971) und EKINS (1972) weisen in ihren theoretischen Analysen des RIAs nach, daß beide Wege hinsichtlich der Sensitivität des Assays im wesentlichen gleichwertig sind. Ein geringer Vorteil besteht jedoch bei der Messung von "B" (EKINS, 1972). Eine Literaturübersicht der von verschiedenen Autoren für Aldosteron-Assays verwendeten Separationstechniken findet sich im 2. Kapitel. Wie aus dieser Übersicht hervorgeht, ist die Verwendung von Aktivkohle für Aldosteron-Assays am gebräuchlichsten. Umstritten ist allerdings, ob die Beschichtung mit Dextran eine Verbesserung des Trenneffektes bewirkt. Nach Auffassung von BINOX und ODELL (1972) ist auch unbeschichtete Aktivkohle selbst in Gegenwart von 2,5 - 20 Protein im Ansatz in der Lage "B" und "F" zufriedenstellend zu trennen. Eine geringe, doch signifikante Verbesserung des Trennergebnisses durch Beschichtung insbesondere mit hochmolekularem Dextran (MG 150 000) läßt sich bei niedrigen Proteinkonzentrationen erzielen. Bei hohen Proteinkonzentrationen im Inkubationsmedium ließ sich kein signifikanter Dextraneffekt feststellen. Die unterschiedlichen Auffassungen über den Wert der Dextranbeschichtung gehen auf unterschiedliche Ansichten über die Wirkungsweise des Dextrans zurück: Während HERBERT et al. (1965) die Auffassung vertraten, daß Dextran nach Art eines "Molekularsiebes" selektiv die Bindung von AG-AK-Komplexen gegenüber der Bindung von freiem AG benachteiligt, behauptet BINOX (1972), daß Dextran ebenso wie Proteine sowohl die Bindung von freiem als auch von gebundenem AG reduziert, indem es die Gesamtzahl der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen reduziert. BINOX und andere Autoren (nach BINOX, 1973) empfehlen bei hohen Proteinkonzentrationen zu arbeiten, da dann größere Aktivkohlemengen verwendet werden können, die totale Adsorptionsmenge von "F" ansteigt und somit die Präzision zunimmt. Es sei nochmals betont, daß es primär darauf ankommt, daß die Proteinkonzentration in allen Ansätzen gleich ist. Dies läßt sich z.B. durch Zusatz von Protein zum Inkubationsmedium oder kurz vor dem Trennungsprozeß erreichen. Die Testung eines Adsorbens bezüglich seiner Adsorptionseigenschaften für ein bestimmtes AG kann nach folgendem Schema durch die Erstellung verschiedener Adsorptionskurven erfolgen:

1. Bestimmung der optimalen Adsorbenskonzentration:

1.1. Adsorptionsverhalten wenn nur AG, also "F" im Inkubationsmedium enthalten ist.

1.2. Adsorptionsverhalten wenn AG und AK im Überschuß im Inkubationsmedium sind.

Es wird diejenige Adsorbenskonzentration für das weitere Vorgehen ausgewählt, für die der Quotient aus der prozentualen Adsorption von AG/Adsorption von AG in Gegenwart von AK ("Trennschärfe") möglichst groß ist.

2. Untersuchung der Reproduzierbarkeit (Präzision) des Adsorptionsverhalten bei der optimalen Adsorbenskonzentration durch wiederholte Versuche.

3. Untersuchung des Einflusses steigender Proteinkonzentrationen auf das Adsorptionsverhalten. Die Versuche werden wieder mit der im 1. Schritt bestimmten optimalen Adsorbenskonzentration durchgeführt.

4. Untersuchung des Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Adsorbens.

Für Aktivkohle bestimmte BINOUX (1973) maximale Adsorption bereits nach 15 min. Der Maximalwert bleibt etwa 60 min stabil.

6.9. Probenvorbereitung: Extraktion und Chromatographie

Die direkte Zugabe eines Assayproteins zu einem unveränderten biologischen Probenmaterial, z.B. Serum, Urin oder Gewebe, ist in den meisten Fällen nicht möglich und für einen

Aldosteron-Assay bis heute noch in keinem Fall beschrieben. Mangelnde Spezifität und zu kleine Assoziationskonstanten der verfügbaren Assayproteine stehen dem im Wege.

Folgende Kategorien von Substanzen können im Einzelfall den Assay stören und müssen durch eine Extraktion und eventuell einen oder mehrere chromatographische Reinigungsschritte abgetrennt werden (EKINS, 1970; MURPHY, 1970).

1. Kreuzreagierende Analogsubstanzen, insbesondere wenn sie in hohen oder gar wesentlich höheren Konzentrationen als die Testsubstanz P vorliegen. Dies trifft z.B. für das Konzentrationsverhältnis von Cortisol zu Aldosteron im Plasma zu. Die Abtrennung der kreuzreagierenden Substanzen stellt das Hauptproblem der meisten RIAs dar.

2. Interferierende Bindungsproteine: In anderem Zusammenhang wurde bereits darauf hingewiesen, daß es für Aldosteron kein solches Bindungsprotein im Plasma gibt. Für andere Steroidassays kann die Abtrennung von CBG (Corticosteroid-binding-globulin) oder SHBG (sex-hormone-binding-globulin) durch Präzipitation mit organischen Lösungsmitteln erfolgen.
3. Substanzen welche die Gleichgewichtskonstante der Reaktion zwischen P (AG) und Q (AK) beeinflussen.
4. Substanze, die die Effizienz der Trennung von "B" und "F" beeinflussen.
5. Substanzen, wie z.B. Enzyme, die die Testsubstanz während der Lagerung oder Inkubation verändern.

Darüber hinaus kann eine Anreicherung der Testsubstanz dann notwendig sein, wenn ihre initiale Konzentration unter der Erkennungsgrenze des Assays liegt.

Das Extraktionsverfahren und die sich daran anschließenden Reinigungsschritte müssen eine Eliminierung der vorgenannten Fehlerquellen gewährleisten. Andererseits ist darauf zu achten, daß Extraktion und Chromatographie nicht ihrerseits durch Verunreinigung des Extraktes respektive Eluates zur Ursache für die Entstehung eines sogenannten "Blanks"¹ werden.

Summarisch ist zu fordern:

Alle dem Assay vorangehenden Prozeduren mit der Probe sollen gewährleisten, daß sich der endgültige Inkubationsansatz in nichts außer der Konzentration der Testsubstanz P von den Standards unterscheidet.

6.10. Kalkulation der Wiederfindung ("Recovery") nach der Probenvorbereitung

Da die Verluste an Testsubstanz während der Probenvorbereitung nicht unerheblich sind, wird jeder Probe zu Beginn ein Verlustindikator P^* , d.h. eine definierte Menge radioaktiv markierter Testsubstanz, zugesetzt. (Nur VETTER (1973) beschreibt ein Aldosteron-Assay ohne internen Standard). Die Berechnung der Ausbeute ("Recovery") erfolgt durch Messung der Aktivität von

¹ Als "Blank" wird vorläufig eine positiv oder negativ von der "o-response" der Eichkurve abweichende "response" einer testsubstanzfreien Probe, die die gesamte Probenvorbereitung durchlaufen hat, bezeichnet.

P^*_1 in einem Teilvolumen ("aliquot") der für die Inkubation vorgesehenen endgültigen Probe und Vergleich dieses Wertes mit der anfangs eingesetzten Radioaktivität an Verlustindikator:

$$\text{Rec } (\%) = \frac{\text{cpm nach Probenvorbereitung} \times 100 \times a}{\text{cpm Verlustindikator zu Beginn}}$$

$$\frac{a}{m} = \frac{\text{Gesamtvolumen der Probe vor Assay}}{\text{Teilvolumen für Wiederfindungsanalyse}}$$

Voraussetzungen für die Zuverlässigkeit einer Wiederfindungsanalyse sind (EKINS, 1970):

1. vollkommene chemische Übereinstimmung von P und P^*
2. radiochemische Reinheit von P^*
3. P und P^* in der Probe müssen vor Beginn der Extraktion äquilibriert sein.

Derartige strenge Qualitätsanforderungen an den Tracer P^* sind nur bei der Verwendung als Verlustindikator nötig. Für den Tracer P^* , welcher im Assay selbst Verwendung findet, brauchen nicht so strenge Forderungen erfüllt werden - dort ist dagegen gleiches Verhalten des Tracers in Proben und Standards unerlässlich -.

Die als Verlustindikator eingesetzte Menge an Tracer kann in den meisten Assays nicht zugleich als Tracer für den Assay selbst verwendet werden, da die Ausbeuten von Probe zu Probe wechseln und dann ungleiche Bedingungen hinsichtlich der Konzentration der radioaktiven Testsubstanz im Assay bestehen würden, was Schwankungen der Sensitivität von Probe zu Probe zur Folge hätte. Man setzt daher als Verlustindikator eine sehr geringe Menge an P^*_1 ein, die gegenüber der im eigentlichen Assay verwendeten Menge P^*_2 vernachlässigbar klein ist. Auf diese Weise gilt annäherungsweise $P^*_1 + P^*_2 = P^*_1 = \text{constant}$.

6.11. Blank-Problem

Als "Blank" wird in der RIA-Terminologie ein komplexes Phänomen bezeichnet, das aus verschiedenen Alterationen der AG-AK-Reaktion resultiert (PIZZARRO, 1972). Dieses Phänomen äußert sich in Verschiebungen der "Probeneichkurve" ¹ gegenüber der "Standardeichkurve" ²

¹ Als "Probeneichkurve" wird eine Eichkurve bezeichnet, die außer den "Standards" noch Eluate oder Abdampfrückstände von Leerproben enthalten, die zuvor die gesamte oder Teilabschnitte der Probenvorbereitung - i.e. Extraktion, Chromatographie etc. - durchlaufen haben.

² Als "Standardeichkurve" wird die übliche Eichkurve bezeichnet, die ausschließlich mit definierten Standards erstellt wird.

und ist in der Regel durch Einflüsse oder Substanzen aus der Probenvorbereitung bedingt. Die im Abschnitt 6.9. über die Probenvorbereitung gegebene Definition des "Blank" umfaßt somit nur einen Teil des Phänomens, nämlich den Blank bei der Dosis 0. Tatsächlich ist jedoch der "Blank" keineswegs über den gesamten Bereich der Eichkurve konstant, d.h. das Ausmaß der Abweichung der Probeneichkurve von der Standardeichkurve variiert erheblich mit zunehmender Dosis der Testsubstanz (Abb. 4). Aus diesem Grunde darf man Blanks nicht einfach vom Meßwert subtrahieren in der Annahme, dann auf den richtigen Wert zu kommen (PIZARRO, 1972; EKINS, 1972).

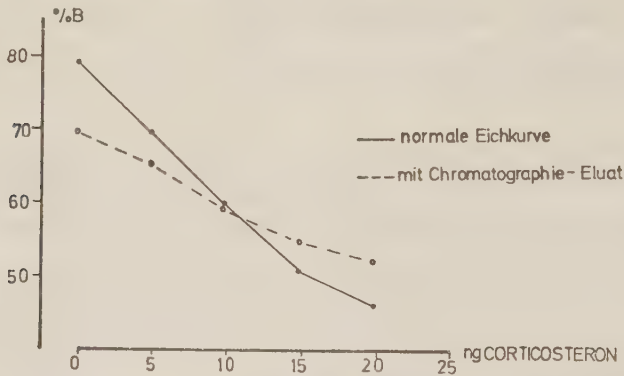


Abb. 4: Uneinheitlichkeit des Blanks bei verschiedenen Steroidkonzentrationen (nach PIZARRO, 1972)

Über die Natur des Blanks besteht nach wie vor Unklarheit. Dennoch sind verschiedene Annahmen über den Wirkungsmechanismus des Blanks bereits möglich (EKINS, 1972; PIZARRO, 1972):

Die "Blank"-Faktoren könnten

1. die Tertiärstruktur des Assayproteins verändern, dadurch die Assoziations- und Dissoziationskonstante verändern und letztlich die Energie der Reaktion zwischen AG und AK beeinflussen.
2. die Zahl der verfügbaren Bindungsstellen am Assayprotein verändern (nicht kompetitive Hemmung)
3. mit der Testsubstanz um die Bindungsstellen am Assayprotein konkurrieren (kompetitive Hemmung).
4. selbst eine Affinität zur Testsubstanz besitzen.
5. die Charakteristik der Trennung von "B" und "F" beeinflussen.

Jeder dieser Mechanismen kann für sich allein oder zusammen mit anderen Ursache für das Blank Phänomen sein. MURPHY (1970) interpretiert den Blank als "nichtkompetitiven allosterischen Hemmeffekt der Grundreaktion", also im Sinne des 2. Mechanismus.

Da ein Blank die Ergebnisse jedes Assays wertlos macht weil er – wie oben erläutert – nicht einfach mathematisch subtrahierbar ist, muß man eine Blankeliminierung durch Auswahl geeigneter Bedingungen für jeden Assay im Einzelfall versuchen. Zwar lassen sich keine allgemeinen Vorschriften zur Blankeliminierung geben, aber immerhin sind inzwischen einige häufige Blankursachen erkannt und es gibt zahlreiche Vorschläge zu ihrer Eliminierung:

- a) organische Lösungsmittel ergeben häufig unabhängig von ihrem Reinheitsgrad einen nicht genau vorausagbaren Blank. MURPHY (1970) nimmt an, daß dieser Blank etwa dem Volumen des verwendeten Lösungsmittels proportional ist. Als Abhilfe empfiehlt er wiederholte Redestillation alle 1 – 2 Wochen. LEYENDECKER et al. (1972) gelang es diesen Blank durch Zusatz von 10 % Gamma-Globulin zum Inkubationsmedium zu eliminieren.
- b) die Dünnschichtchromatographie (DC) ist häufig die Ursache eines schwer eliminierbaren Blanks. Da die DC für Steriode gute und rationelle Trennungsmöglichkeiten bietet, ist diese Tatsache besonders ärgerlich. MURPHY (1970) gibt eine Übersicht der Versuche verschiedener Autoren einen DC oder PC-Blank zu eliminieren, doch leider sind die meisten der beschriebenen Verfahren nicht zuverlässig reproduzierbar. Am geeignetsten erscheint nach übereinstimmenden Berichten von MURPHY und PIZARRO Erhitzung von Silica-Gel-Platten auf $500-550^{\circ}$ über 60 min.
Eigene Versuche, einen Aldosteron RIA mit Dünnschichtchromatographie zu erstellen, scheiterten ebenfalls an dem nicht eliminierbaren Blank nach der DC.
- c) ein Papierchromatographie -Blank ist nach Ansicht von MURPHY nicht ganz so häufig und auch nicht so schwierig zu beseitigen wie ein DC-Blank. Tatsächlich enthalten die von EKINS, BANKS, ITO, BAYARD und MAYES beschriebenen Aldosteron-Assays alle eine papierchromatographische Reinigung. Die Blankeliminierung wird entweder durch Vorbehandlung des Papiers mit Silicagel (Whatman SG 81 Papier) oder Methanol durch eine nachgeschaltete Silica Säule, oder durch Verwendung eines Phosphatpuffers an Stelle von Methanol als Elutionsmittel erzielt. Der von ITO (1972) beschriebene Aldosteron-Assay enthält keinerlei besondere Vorkehrungen zur Blankeliminierung und ist dementsprechend auch nicht Blank-frei. Eine Übersicht der bisher in Aldosteron-Assays verwendeten Reinigungstechniken einschließlich der Vorkehrungen zur Blankverhinderung gibt Tab. 1.

d) die Säulenchromatographie mit Sephadex LH 20 ergibt bei der Anwendung in Assays für Progesteron (MURPHY, 1970; PIZARRO, 1972), 17 alpha-Hydroxyprogesteron und Des-oxy corticosteron (MURPHY, 1970) keinen eigenen Blank. Sephadex ist inert gegenüber Steroiden. ITO et al. (1972) beschreiben einen Aldosteron-Assay mit einer LH 20-Chromatographie und geben einen Blank von $4,4 \pm 3,0$ pg/Probe für die Dosis 0 an. Wie aus den Ausführungen über den Blank zu Beginn dieses Abschnittes hervorgeht genügt diese Feststellung nicht, um eine Aussage über den Blank in der gesamten Bandbreite der Eichkurve zu machen. Ein geringer dennoch verbleibender Blank kann auf die verwendeten Lösungsmittel zurückzuführen sein.

Durch Verwendung sehr englumiger Säulen kann das Elutionsvolumen und somit auch der Lösungsmittelbedingte Blank klein gehalten werden. Die Säulenchromatographie hat gegenüber PC und DC den Vorteil, daß umständliche Elutionsprozeduren vermieden werden, aber den Nachteil, daß permanente Überwachung erforderlich ist. Die Reproduzierbarkeit ist nach Angaben von MURPHY gut.

e) Plastikgefäße und Instrumente können ebenfalls eine Blankursache sein. Man vermeidet sie am besten durch die Verwendung von Glasgeräten während der Probenvorbereitung. (Die Verwendung von Plastikgefäßen zur Inkubation ist dagegen hinsichtlich des Blanks belanglos, solange die Eichkurven in den gleichen Gefäßen erstellt werden).

f) Durch Erhöhung der Ionenstärke des verwendeten Puffers gelang MURPHY (1970) in einigen Fällen eine Blankreduzierung.

6.12. Assaybedingungen (MURPHY, 1970)

Besitzt das Assayprotein eine hohe Assoziationskonstante, so ist die Auswahl des Inkubationsvolumens lediglich eine Frage der Übereinkunft. Ein ml Inkubationsvolumina, wovon 0,5 ml Überstand nach Zugabe eines Adsorbens für die Messung verwendet werden, lassen sich sehr genau pipettieren. Bei Verwendung von Assayproteinen mit geringerer Assoziationskonstante läßt sich der Meßbereich durch Arbeiten mit kleineren Inkubationsvolumina verringern.

Die Inkubationstemperatur sollte zwischen 4 und 6 °C liegen, da dann die Assoziationskonstante höher als bei Zimmertemperatur ist. Andererseits verlängert sich aber durch die niedrige Temperatur die Inkubationszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtes. Die Inkubationszeit hängt außerdem von der Verdünnung der Reaktionspartner und der Art des Assayproteins ab: Große Verdünnungen erfordern längere Zeit, Antikörper reagieren erheblich langsamer als Plasmaproteine.

6.13. Zuverlässigkeitskriterien

Die Validität eines Assays muß an Hand von vier allgemeingültigen Zuverlässigkeitskriterien überprüft werden. Sie sind Ausdruck der systematischen und statistischen Fehler der Methode.

6.13.1. Die Richtigkeit ("accuracy")

Eine Messung ist dann richtig, wenn der gemessene Wert identisch mit dem tatsächlichen ist. Die Richtigkeit ist als Hauptkriterium den Kriterien Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität übergeordnet. Um richtig zu sein muß ein Wert reproduzierbar sein und darf keinen systematischen oder zufälligen Fehler enthalten. REEVES et al. (1970) geben drei Hauptquellen für systematische Fehler in RIAs an:

- größere unerkannte technische Fehler

- schlechte Eichkurven

- systematische Fehler bei der Korrektur der Verluste oder durch unerlaubte Blankkorrektur.

Die Erfassung derartiger Fehler erfolgt durch Richtigkeitskontrollen, die folgendermaßen durchgeführt werden:

Primär testsubstanzfreies Material – also z.B. Plasma von adrenaletomierten Patienten oder steroidfrei gemachtes Plasma ("charcoal stripped plasma") wird mit ansteigenden Mengen eingewogener Testsubstanz versetzt, analysiert und die Meßergebnisse mit den tatsächlichen Zusätzen verglichen. Das Ergebnis der Richtigkeitskontrolle wird in Form der Gleichung der Geraden nach Abb. 21 angegeben. Die Richtigkeit ist optimal, wenn die Steigung der Geraden 1 ist und sie durch den o/o Punkt geht.

6.13.2. Die Spezifität ("specificity")

Die Spezifität eines Assays ist ideal, wenn der Anteil gebundenen Tracers (AG^* -AK-Komplex) im Inkubationsansatz einzig proportional der enthaltenen Menge endogener Testsubstanz ist. Eine Reduzierung des gebundenen Anteils (% B) ist dann "spezifisch", wenn sie nur durch das AG selbst bedingt ist. Diese Definition des Begriffes "spezifisch" ist enger als die von SÖNKSEN (1972) gegebene (BESSER, 1972). Kreuzreaktionen des Assayproteins mit Fragmenten oder Metaboliten des AGs oder ähnlich strukturierten Substanzen ergeben nach unserer Definition

"nicht-spezifische" Effekte.

Darüber hinaus sind "unspezifische" Effekte in einem Assay zu beachten, welche auf ein ungleiches Verhalten von der Testsubstanz in Probe und Standard zurückzuführen sind. Als Ursachen solch unspezifischer Effekte in den Proben kommen in Frage (SÖNKSEN, 1972): pH-Wert, Inkubationstemperatur, Proteinkonzentration- und art, Komplementgehalt, Enzymgehalt, Ionenstärke, Osmolarität, Hämolyse, Harnstoffkonzentration, Lipämie, Gallensalze und Detergentien.

Angriffspunkte dieser unspezifisch wirkenden Parameter können

1. das markierte AG selbst,
2. die AG-AK-Reaktion,
3. die Trennung von "F" und "B" und
4. die Aktivitätsmessung im Überstand sein.

Die Spezifität eines Assays wird durch zwei wesentliche Elemente bestimmt (MIDGLEY, 1970)

- a) die Konzentration der Testsubstanz und ihre Affinität zu dem verwendeten Assayprotein
- b) die Konzentration und Affinitäten der Kontaminationen in der Probe.

Ein Mangel an Spezifität kann dementsprechend zwei primäre Ursachen haben:

1. Wettbewerb anderer Substanzen (als die Testsubstanz) um die Bindungsstellen des Assayproteins ("nicht spezifische Effekte").
2. "Unspezifisch" wirkende Kontaminationen, die z.B. die Gleichgewichtskonstante der Grundreaktion zwischen Assayprotein und Testsubstanz verändern.

Aus dem Gesagten ergeben sich zwei grundsätzliche Alternativen für den Entwurf eines spezifischen Assays:

entweder man verwendet ein nichtdiskriminierendes Bindungsprotein und sorgt für ausreichend Reinheit der Proben,

oder man verwendet eine hochspezifische Bindungssubstanz und verzichtet auf eine intensive Reinigung der Proben.

Da es eine absolute Spezifität weder bei Antikörpern noch bei nativen Plasmabindungsproteinen oder Gewebsproteinen gibt, muß man in der Praxis immer durch Richtigkeitskontrollen überprüfen, ob die vorgenommenen Reinigungsschritte ausreichen, eine genügende Spezifität zu gewährleisten.

Die Auswahl eines spezifischen AKs mit möglichst geringer Kreuzreaktivität, der also geringe "nicht spezifische" Effekte ergibt, wurde in Abschnitt 6.7. besprochen.

Zur Vermeidung "unspezifischer" Effekte ist insbesondere Übereinstimmung der Protein-Konzentrationen in Standards und Serumproben wichtig. Im Idealfall sollte die Standardkurve mit "hormonfreiem Probenmaterial" ¹ in der gleichen Konzentration wie es in den Proben enthalten ist, erstellt werden.

Der Einfluß von Komplement läßt sich durch Zusatz von EDTA (0,01 mol/l) vermindern.

Zur Kontrolle unspezifischer und nichtspezifischer Effekte empfehlen BERSON & YALOW (1968, 1970):

1. Die Bestimmung der Testsubstanz bei verschiedenen Verdünnungen des Probenmaterials.
Fällt die Hormonkonzentration linear mit dem Verdünnungsfaktor ab, so sind unspezifische Effekte weitgehend ausgeschlossen. Als Verdünnungsmedium für diese Untersuchung sollte im Idealfall hormonfreies Probenmaterial - i.e. Plasma - verwendet werden, um die Ionenstärke konstant zu halten.
2. Vergleich von Pufferansätzen und hormonfreien Proben (Plasma)-ansätzen.
3. Richtigkeitsproben mit definierten Zusätzen an Testsubstanz.
4. Vergleichende Bestimmungen mit mehreren Antisera.

Die vorangehenden Überlegungen zur Spezifität gelten gleichermaßen für alle Assayproteine. Bei der Verwendung von Antikörpern als Assayprotein muß außerdem die Korrelation zwischen Immunreaktivität und Bioaktivität in die Prüfung einbezogen werden (BERSON & YALOW, 1968; HARD, 1972). Die Spezifität der RIA-Grundreaktion ist immunochemisch bedingt und braucht nicht notwendigerweise mit der biologischen Aktivität übereinzustimmen. Eine Dissoziation zwischen Immun- und Bioaktivität ist sogar recht häufig, wie sich durch den Nachweis von Hormonfragmenten und Hormonmetaboliten in RIAs demonstrieren läßt. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß die Bioaktivität eines Hormons in Bezug auf verschiedene Wirkungsqualitäten, z.B. in verschiedenen Geweben, variieren kann.
Schlüsse auf die Bioaktivität einer durch RIA gemessenen Substanz sind nur nach Beantwortung folgender Fragen möglich:

1. Sind Fragmente, Metaboliten oder Präkursoren der Testsubstanz in dem zur Messung verwendeten Material enthalten?
2. Werden diese biologisch inaktiven Bestandteile durch den RIA miterfaßt?

Hormonfreies Plasma läßt sich durch Aktivkohle-Behandlung und anschließender Ultrafiltration herstellen (SÖNKSEN, 1972).

Die Übereinstimmung oder Proportionalität zwischen Bioaktivität und Immunaktivität läßt sich durch Korrelierung von RIA-Ergebnissen mit Parametern, welche Hormonwirkungen darstellen, nachweisen, z.B. ACTH und 17-OHCS-Spiegel, Aldosteron und K^+ Plasma-spiegel.

6.13.3. Die Genauigkeit ("precision")

Die Genauigkeit ist eine Kenngröße für die Reproduzierbarkeit einer Messung und wird gewöhnlich in Form der Standardabweichung bzw. des Variationskoeffizienten vom Mittelwert mehrerer Bestimmungen angegeben. Dabei geht man von der Annahme aus, daß die Einzelwerte in einer Normalverteilung um den Mittelwert gruppiert sind (EKINS, 1970). Je nachdem ob man Mehrfachbestimmung innerhalb eines Assays - also auf der gleichen Eichkurve bestimmte Werte - oder Messungen von verschiedenen Tagen vergleicht, erhält man den "Intraassay-Variationskoeffizienten" oder den "Interassay-Variationskoeffizienten". Je größer die Genauigkeit um so geringer ist die relative Unsicherheit des einzelnen Meßwertes.

Mathematisch läßt sich die Genauigkeit ausdrücken als

$$\Delta h = \frac{\Delta R_h}{dR/dh}$$

wobei h der Mittelwert aller vergleichbaren Messungen,

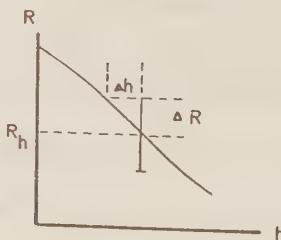
Δh die Präzision der Messung von h ,

ΔR_h die Standardabweichung der Messung der "response" R_h ,

dR/dh die Steigung der Eichkurve am Meßpunkt ist

(BERSON & YALOW, 1968; EKINS, 1970).

Abb. 5 Präzision



Die Genauigkeit ist abhängig von drei voneinander unabhängigen Parametern (EKINS, 1972):

1. von der Steilheit der Eichkurve (je steiler die Eichkurve um so präziser die Messung)
2. von den in der Messung enthaltenen Fehlern, die sich wiederum aus zwei Komponenten zusammensetzen:
 - 2.1. den experimentellen Fehlern
 - 2.2. dem statistischen Zählfehler.

Jeder dieser Parameter ist seinerseits von der Konzentration der Reagentien im Assaysystem abhängig: Die Steilheit der Eichkurve von der AK-Konzentration, die experimentellen und statistischen Fehler von der Tracer-Konzentration, dessen spezifischer Aktivität, dem Inkubationsvolumen und der Anzahl der insgesamt gezählten Zerfälle.

Es ist nicht sinnvoll von der "Präzision eines Assays" in toto zu sprechen, vielmehr sollte die Präzision immer für einen genau definierten Bereich der Meßgröße angegeben werden. Dies läßt sich aufgrund der unterschiedlichen Steilheit der Eichkurve in verschiedenen Dosisbereichen leicht einsehen. Als Arbeitsbereich eines Assays ist dann der Bereich zu kennzeichnen, in dem mit einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ je nach Erfordernissen gemessen werden kann. BERSON und ALLOW (1968) weisen nach, daß die Präzision unabhängig von der Gleichgewichtskonstante K ist, wenn die Konzentration der Valenzen des Assayproteins $[AK]^0$ hinreichend groß ist. Andererseits verringert sich die zur Erzielung einer vorgegebenen Präzision notwendige Konzentration des AGs um so mehr, je größer die Gleichgewichtskonstante des verwendeten Assayproteins ist.

Die maximale Präzision wird bei Verwendung hoher Konzentrationen der Testsubstanz (AG) und des Assayproteins (AK) erzielt, weil dann die Quantität des Tracers nicht wesentlich eingeschränkt werden braucht. In der Frage der Tracerkonzentration geraten die Optimierungskriterien Präzision und Sensitivität in Widerspruch. Ansonsten sind die Bedingungen für die Optimierung von Präzision und Sensitivität die gleichen.

13.4. Die Sensitivität ("sensitivity")

Die Sensitivität kennzeichnet die Fähigkeit des Assaysystems kleine Mengen der Testsubstanz mit hinreichender Genauigkeit zu messen. Die Sensitivität beschreibt somit nur einen Grenzfall der Genauigkeit, nämlich die Präzision des Systems bei der Messung der Dosis 0 (EKINS, 1970).

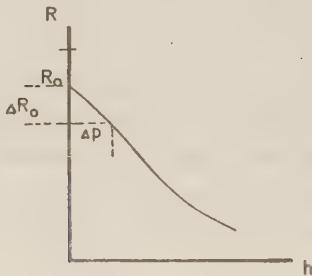
Nach dieser Definition von EKINS ist das Kriterium Sensitivität identisch mit der häufig angegebenen "minimalen meßbaren Menge" ("minimum detectable amount"; "detection-limit"). Sie wird angegeben als diejenige Menge Testsubstanz, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ($> 95\%$) von der Menge 0 unterschieden werden kann.

Formal läßt sich die Sensitivität einer Eichkurve entsprechend der Präzision darstellen

$$\text{Sensitivität} = \frac{\Delta R_o}{(\Delta p) \cdot dR/dh}$$

wobei $\Delta R_o = 2 \times \text{SD der } ^0\text{O-response}$

Abb. 6 Sensitivität



modifiziert nach EKINS 1970

Die Sensitivität darf nicht einfach mit der Steilheit der Kurve gleichgesetzt werden (EKINS, 1970).

Die Optimierung der Sensitivität ist eines der Hauptprobleme bei der Erstellung eines Assays. Entscheidend ist auch hier die Auswahl geeigneter Konzentrationen der Reaktionspartner. Es besteht wie bei der Präzision eine Abhängigkeit von

- a) der Steilheit der Eichkurve (für die Dosis O)
- b) den in der Messung enthaltenen Fehlern.

Folgende Bedingungen müssen erfüllt sein, um einen sensitiven Assay zu erzielen (BERSON & YALOW, 1968; EKINS, 1970):

1. Die Tracermenge muß sehr gering sein, so daß $(AG^*) \ll (Ab^0)$ und $"B^*" \ll (Ab^0)^1$ ist.
2. Der Antiserumtiter muß so gewählt werden, daß bei der Dosis O der Quotient $B/F = 0,5$ und dementsprechend $\% B = 33$ ist.
3. Die Gleichgewichtskonstante von Tracer und Testsubstanz muß identisch sein. Unterschiede vermindern die Sensitivität.
4. Das verwendete Assayprotein soll eine möglichst große Gleichgewichtskonstante haben.
5. Der Zählfehler muß durch ausreichend lange Zählzeiten, Verwendung von Tracer hoher spezifischer Aktivität, große Inkubationsvolumina und Einsetzen von Probenmengen, welche eine große Zählausbeute ergeben (also größere Proben, wenn "F" gezählt wird, kleinere Proben wenn "B" gezählt wird) verringert werden. Die Bedingungen für optimale Sensitivität variieren also je nachdem welcher AG-Anteil - "F" oder "B" - zur Messung herangezogen wird (EKINS, 1972).
6. Die experimentellen Fehler müssen streng kontrolliert werden. Da diese in der Regel deutlich dominieren, sind Versuche den Zählfehler zu reduzieren nur in Grenzen sinnvoll.
7. Der Einfluß des Inkubationsschemas auf die Sensitivität ist zu beachten (RODBARD, 1971):
 - a) inkubiert man Tracer und Testsubstanz gleichzeitig mit dem Assayprotein so ergibt die Messung im Gleichgewichtszustand den sensitivsten Assay,
 - b) inkubiert man zunächst die Testsubstanz mit dem Assayprotein und gibt den Tracer verzögert zu, so resultiert im Ungleichgewichtszustand eine verbesserte Sensitivität,
 - c) inkubiert man zunächst Tracer und Assayprotein und gibt die Testsubstanz verzögert zu, so ist wie im Fall a) die Messung im Gleichgewicht für die Sensitivität am vorteilhaftesten.

¹ (Ab^0) ist die Gesamtkonzentration der Bindungswerten des Assayproteins.

"B" ist die gebundene Tracermenge.

6.14. Optimierter Assay

EKINS (1970, 1972), RODBARD (1970^{1,2}, 1971, 1974) und BERSON & YALOW (1968, 1970) haben mathematische Theorien des RIAs und ähnlicher Verfahren entwickelt. Mit Hilfe dieser Theorien ist es möglich, die Bedingungen, i.e. die optimalen Konzentrationen der Reaktionspartner für einen optimal sensitiven, präzisen und spezifischen Assay im Einzelfall, d.h. für eine bestimmte Zielkonzentration ("target hormone concentration"), zu errechnen.

Auf die praktischen Konsequenzen aus diesen theoretischen Überlegungen wurde in den vorangegangenen Abschnitten wiederholt hingewiesen. Ohne im Detail auf die mathematische Theorie einzugehen, seien hier nur summarisch die Ansatzpunkte für die Optimierung eines Assays genannt:

1. Der Assayentwurf
2. Das Meßsystem
3. Das Kalkulationsverfahren und die statistische Kontrolle.

6.15. Allgemeine Vorschriften für die Routine (MURPHY, 1970)

1. Aufbewahrung der Proben:

Steroide scheinen in Plasma und Urinproben tiefgefroren über Jahre stabil zu sein.

2. Die Aufbewahrung von ³H-markierten und unmarkierten Steroiden sollte im Kühlschrank in redestilliertem Äthanol erfolgen. Wässrige Lösungen sind schlecht haltbar. Gefrieren radioaktiven Materials soll vermieden werden, weil es den Zerfall begünstigt.
3. Die Assayproteine sollten entweder tiefgefroren bei -20 °C (ITO, 1972; MURPHY, 1970) oder lyophilisiert (OLIVIERI, 1971) aufbewahrt werden. Wiederholtes Auftauen ist zu vermeiden; deshalb sollte die Aufbewahrung in kleinen Portionen erfolgen. Über die Haltbarkeit verdünnter Lösungen lassen sich keine generellen Aussagen machen. St. CYR (1972) berichtet, daß 1 : 1 000 verdünnte Aldosteron-Antiseren bei 4 °C über 12 Monate und 1 : 400 000 verdünnte Aldosteron-Antiseren bei 4 °C über 6 Wochen haltbar sind. HURN (1971) empfiehlt, auch verdünnte Antiseren tiefgefroren aufzubewahren, um einen Titerabfall zu vermeiden.

Nach unseren eigenen Erfahrungen kommt es bei stark verdünnten Aldosteron-Antiseren (1:150 000) unter Aufbewahrung bei Kühlschranktemperatur bereits nach einigen Tagen zu einem deutlichen Titerabfall.

II. AUFGABENSTELLUNG

Die Bedeutung der Aldosteronanalyse im Plasma für die Differentialdiagnose der arteriellen Hypertonie einerseits und für die Aufklärung der Mechanismen der Aldosteronregulation andererseits wurde im Abschnitt 5 eingehend erörtert.

Ausgehend von diesen Erfordernissen wurde folgende Aufgabe gestellt:

1. Eine für die klinische Praxis brauchbare radioimmunologische Methode zur Analyse von Plasmaaldosteron zu entwickeln.
 1. 1. Das benötigte Plasmavolumen sollte nicht mehr als 5 ml betragen, um auch wiederholte Bestimmungen bei einem Patienten ohne wesentlichen Blutverlust zu ermöglichen.
 1. 2. Die Methode sollte in möglichst kurzer Zeit und mit dem geringstmöglichen experimentellen Aufwand durchführbar sein.
 1. 3. Die Probenkapazität pro Zeiteinheit sollte möglichst groß sein.
 1. 4. Die Methode sollte zuverlässig reproduzierbare, richtige Ergebnisse liefern und ausreichend empfindlich sein, um auch Messungen subnormaler Aldosteronkonzentrationen zu ermöglichen.
 1. 5. Die Kalkulation der Ergebnisse sollte in rationeller Weise durch EDV erfolgen.
2. Die Kriterien der Zuverlässigkeit sollte für die neue Methode eingehend geprüft werden.
3. Es sollte versucht werden, mit der neuen Methode einige Einblicke in die Regulation des Plasmaaldosteron-Spiegels zu gewinnen:
 3. 1. Durch Untersuchungen über die Abhängigkeit des Plasmaaldosterons von der Körperlage.
 3. 2. Durch Vergleiche der Plasmaaldosteronkonzentration unter Elektrolyt-bilanzdiät (EBD) und nach 3-tägiger NaCl-Belastung.
 3. 3. Durch Bestimmung von Aldosteron-Tagesprofilen unter Kontrollbedingungen und unter pharmakologischer ACTH-Suppression.
 3. 4. Durch Analysen des circadianen Plasmaaldosteron-Rhythmus an Patienten mit Conn-Syndrom.

Es sei darauf hingewiesen, daß Abschnitt 2. 3. auf dem Stand der methodischen Entwicklung Ende 1974 basiert. Bei Beginn dieser Arbeit im Spätsommer 1972

hatten erst drei Arbeitsgruppen (BAYARD, 1970; MAYES, 1970; ITO, 1972) über Erfahrungen mit Aldosteron-RIAs berichtet.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. ENTWICKLUNG EINES RADIOIMMUNOASSAYS FÜR DIE ANALYSE DES PLASMAALDOSTERONS

1.1. Wahl eines geeigneten Adsorbens zur Trennung von freiem und anti-körpergebundenem Aldosteron

In einem Vorversuch wurden die Adsorptionseigenschaften von Florisil (Mg-trisilikat) und Aktivkohle gegenüber Aldosteron untersucht.

1.1.1. Florisil

In zwei Serien von Eppendorf-Gefäßen wurden definierte Mengen ^3H -Aldosteron (je ca 2600 cpm bzw. 6000 cpm) und unterschiedliche Mengen inaktiven Aldosterons pipettiert, eingengt und wieder in je 1 ml γ -Globulin-Puffer (Reag. Nr. 1) gelöst. Den Proben der ersten Serie wurde zwischen 100 und 700 μl teils dextranbeschichtete, teils unbeschichtete Aktivkohlesuspension (entsprechend 1.6–11.2 mg) (Reag. Nr. 5) zugesetzt. Die Ansätze einer zweiten Serie wurden mit 30 bzw. 60 mg in einigen Fällen vorher hitzeaktiviertem Florisil versetzt. Die Proben der ersten Serie wurden nur kurz von Hand, die der zweiten Serie 10 min. auf dem Eppendorf-Rotationsmischer geschüttelt, da das Florisil sehr schnell sedimentiert. Insgesamt wurden alle Proben dem Adsorbens 30 min. bei 4°C exponiert, dann zwei min. bei 16 000 U/min. und 4°C zentrifugiert und möglichst gleichzeitig je 0.5 ml Überstand für die Messung in Packard-Meßgefäße pipettiert.

Ergebnis:

Bei Verwendung von mindestens 3.2 mg adsorbierte sowohl unbeschichtete als auch dextranbeschichtete Aktivkohle freies Aldosteron in den geprüften Mengen (ca 6300 cpm $\hat{=}$ ca 50–60 pg) nahezu vollständig (99%).

Demgegenüber ist die AG-Adsorption durch Florisil vergleichsweise unzuverlässig: 30 mg nicht aktiviertes Florisil adsorbieren je nach vorgegebener

Tab. 4 : Vergleich des Adsorptionsverhaltens von ¹²⁵I-Florisol (Mg-tri-silikat) und Aktivkohle (Norit A) gegenüber Aldosteron

Adsorptionszeit: 30 min

Reaktionsvolumen: Serie I mit Florisol : 1 ml aqua dest.

Serie II mit Aktivkohle : 1.5 ml 0.6% -
γ-Globulin-Puffer

Serie I

n	³ H-Aldo	Aldo inakt.	Adsorbens		Aktivität in 0.5 ml Überstand	± SD	Rest- aktivität	adsorb.
	(cpm)	(pg)		(μl)	(cpm)	(cpm)	(%) ¹⁾	(%)
4	6294	-	CH/D	500	22.7	15.6	1.08	99.0
3	5300	-	CH/D	500	15.86	1.01	0.89	99.1
3	2650	-	CH/D	500	10.26	1.05	1.16	98.8
3	2650	-	CH/D	500	9.86	8.08	1.12	98.9
2	2650	100	CH/D	500	7.60	-	0.86	99.1
4	6294	-	CH/D	100	121.6	23.2	5.79	94.2
4	6294	-	CH/D	200	40.3	4.3	1.92	98.1
1	2650	-	CH/D	600	7.9	-	0.89	99.1
1	2650	-	CH/D	700	8.4	-	0.95	99.0
3	2225	-	CH	500	4.96	7.3	0.60	99.4
3	2225	50	CH	500	5.03	1.8	0.67	99.3
3	2225	100	CH	500	3.13	7.7	0.69	99.3

Serie II

			(mg)				
3	2650	-	Florisil	30	122.4	13.9	90.8
2	6294	-	Florisil	30	414.9	11.8	86.8
3	2650	-	Florisil	60	70.3	11.1	94.7
4	6294	-	Florisil	60	299.2	23.6	90.5
3	2225	-	Florisil akt.60		57.5	4.6	94.8
3	2225	50	Florisil akt.60		52.0	2.3	95.3
3	2225	200	Florisil akt.60		43.8	7.9	96.1

1) Vor Berechnung der Restaktivität wurde die Radioaktivität in 0.5 ml Überstand auf das jeweilige Gesamtvolumen korrigiert.

Aldosteronmenge zwischen 86,8 und 90,8% der Radioaktivität; mit 60 mg nicht aktivierten Florisils stieg die Adsorption auf 90,5–94,8% für die gleiche Aldosteronmenge im Ansatz. Durch Hitzeaktivierung des Florisils (vgl. Abschn. 3.2.–4) ließ sich die Adsorption mit 60 mg auf 94,8 – 96,1% steigern, doch konnte trotz dieser aufwendigen Vorbehandlung die Adsorptionsfähigkeit der Aktivkohle nicht erreicht werden. (Tab. 4)

Die Aktivkohlesuspension ließ sich darüberhinaus leichter handhaben als das Florisil: Letzteres haftet oft durch elektrostatische Aufladung am Löffel, läßt sich nur sehr schwierig rasch und zugleich in genau gleichen Mengen zu den Proben geben und wird beim Pippettieren des Überstandes leichter aufgewirbelt.

Versuche, Antikörperverdünnungskurven mit 30 mg Florisil als Separationsmittel zu erstellen, schlugen fehl.

Auf Grund dieser Ergebnisse verwendeten wir für die weiteren Untersuchungen Aktivkohle als Adsorbens und unterzogen diese noch einer genaueren Prüfung.

1.1.2. Aktivkohle

1.1.2.1. Vergleichende Bestimmung der optimalen Arbeitskonzentrationen für unbeschichtete und dextranbeschichtete Aktivkohle

Um die Adsorptionsfähigkeit von Aktivkohle(CH) und dextranbeschichteter Aktivkohle (CH/D) gegenüber freiem Aldosteron(AG) in γ -Globulin-Puffer und gegenüber antikörpergebundenem Aldosteron(AG-AK) als Funktion der Adsorbenskonzentration zu prüfen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Versuch:

In 4 Serien mit je 39 Eppendorf-Gefäßen (+ 3 Ansätze für die "100% Wert"-Bestimmung) wurden je ca. 3 000 cpm ^3H -Aldosteron in äthanolischer Lösung pipettiert und bei 37°C unter leichtem Luftstrom eingedampft. Die Proben der Serien I und III wurden dann in je 0,5 ml γ -GP gelöst, die der Serien II und IV in je 0,5 ml Aldosteron-Antiserumlösung, Titer 1:100 000 1 (Reag. Nr. 2) gelöst und kurz geschüttelt. Die 100% Werte wurden wie auch in allen nachfolgenden Experimenten in 1 ml aqua bidest aufgenommen.

¹⁾ Dieser Titer entsprach der AK-Arbeits-Konzentration, die bei Testung mit 1,6%-iger dextranbeschichteter Aktivkohle ein $\%B_o = 50$ ergab.

Zugleich wurden zwei Verdünnungsreihen mit Adsorbenssuspensionen angelegt: Verdünnungsreihe A enthielt Aktivkohle allein in Konzentrationen von 0,002% ($\approx$ 0,01 mg/500 μ l) bis 5% ($\approx$ 25 mg/500 μ l)¹ suspendiert in 0,06%-igem γ -GP(Reag.Nr. 1), Verdünnungsreihe B enthielt die gleichen Konzentrationsstufen Aktivkohle doch mit einem Dextranzusatz von jeweils 1/10 der Aktivkohlemenge gelöst ebenfalls in 0,06% γ -GP.

Nach 16 h Inkubation bei 4°C wurden je drei Ansätzen der Serien I und II jeweils 0,5 ml einer Suspension jeder Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihe A(CH), und je drei Ansätzen der Serien III und IV jeweils 0,5 ml einer Suspension jeder Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihe B(CH/D) zugesetzt, kurz von Hand geschüttelt und nach 30 min Adsorptionszeit² zwei min bei 16 000 U/min zentrifugiert. Von dem Überstand wurden dann je 0,5 ml für die Messung in Packard-Gefäße überführt.

Vom Beginn der Inkubationszeit bis einschließlich dem Zentrifugieren wurden alle Versuchsschritte bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Zum Pipettieren wurden die Assay-Gefäße in ein Eisbad gestellt. Die Messung erfolgte im Packard - Flüssigszintillationszähler Mod. Tri-Carb 2450.

Ergebnisse: (Tab. 5 a/b)

1. Im Konzentrationsbereich von 0,1–5% Adsorbenssuspension wird freies Aldosteron von CH und CH/D gleichermaßen praktisch vollständig adsorbiert. Die Restaktivität im Überstand beträgt in diesem Bereich immer unter 1%, bei Adsorbenskonzentrationen über 0,16% sogar unter 0,1% (Abb. 7 Adsorptionskurven 1 und 2)
2. In den Serien II und IV mit AK-Zusatz werden Unterschiede im Adsorptionsverhalten von CH und CH/D gegenüber antikörpergebundenem Aldosteron deutlich.
- 2.1. Aktivkohle allein adsorbiert in großen Konzentrationen(5%) nahezu die gesamte ³H-Aldosteron-Aktivität(96,66%). Mit fallender Adsorbenskonzentration nimmt die Restaktivität im Überstand zunächst sehr rasch

¹⁾ Konzentriertere Suspensionen ließen sich nicht mehr homogen mischen.

²⁾ Diese Adsorptionszeit hatte sich in Vorversuchen als ausreichend erwiesen, um reproduzierbare Meßwerte zu erhalten. Nach BINOUX et al(1972) besteht bereits nach 15 min ein Gleichgewicht in der Reaktion zwischen AG und CH.

Tab. 5a/b : Untersuchungen über das Adsorptionsverhalten von Aktivkohle mit und ohne Dextranszusatz gegenüber Aldosteron und Aldosteron-Protein-Komplexen

a - Unbeschichtete Aktivkohle

A-Kohle Nr.	Konz. (%)	SERIE I		SERIE II		± SD	Trennschärfe
		Medium	¹⁾ %B _{MW}	Medium	%B _{MW}		
CH-1	5.0	Puffer	99.90	Antiserum	98.74	0.01	1.0117
CH-2	2.5	"	99.97	"	78.41	0.34	1.2749
CH-3	1.0	"	99.95	"	56.93	0.44	1.7556
CH-4	0.5	"	99.84	"	54.71	1.22	1.8349
CH-5	0.25	"	99.91	"	52.68	0.74	1.8965
CH-6	0.1	"	99.91	"	56.91	0.42	1.7555
CH-7	0.05	"	99.04	"	52.83	0.58	1.8746
CH-8	0.01	"	97.88	"	40.88	1.70	2.3949
CH-9	0.002	"	68.62	"	30.90	8.56	2.2214

b - Dextranbeschichtete Aktivkohle

CH/D-Nr.	Konz. (%)	SERIE III		SERIE IV		± SD	Trennschärfe
		Medium	%B _{MW}	Medium	%B _{MW}		
CH/D-1	5.0	Puffer	99.99	Antiserum	69.96	0.93	1.4292
CH/D-2	2.5	"	99.99	"	57.21	0.90	1.7477
CH/D-3	1.0	"	99.95	"	54.19	0.56	1.8444
CH/D-4	0.5	"	99.95	"	52.15	0.62	1.8685
CH/D-5	0.25	"	99.89	"	52.67	0.43	1.8965
CH/D-6	0.1	"	99.68	"	50.48	0.42	1.9746
CH/D-7	0.05	"	98.31	"	46.04	0.54	2.1353
CH/D-8	0.01	"	96.34	"	23.88	2.64	4.0343

1) Die Berechnung von SD ist bei den Serien I und III nicht sinnvoll, da die gemessenen Radioaktivitäten in diesen Proben meist so gering sind, daß der Zählfehler bei der Messung dominiert.

Allen Ergebnissen liegen Dreifach-Bestimmungen zu Grunde.

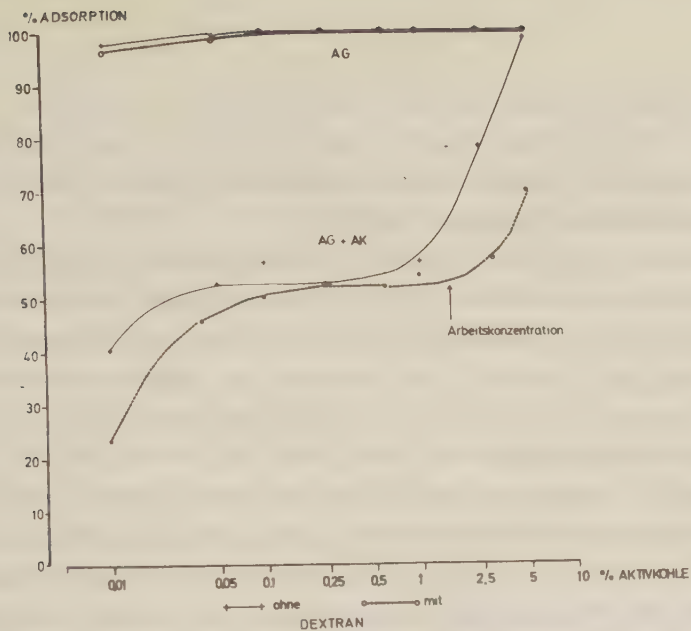


Abb. 7: Adsorption von Aldosteron an Aktivkohle mit und ohne Zusatz von Dextran

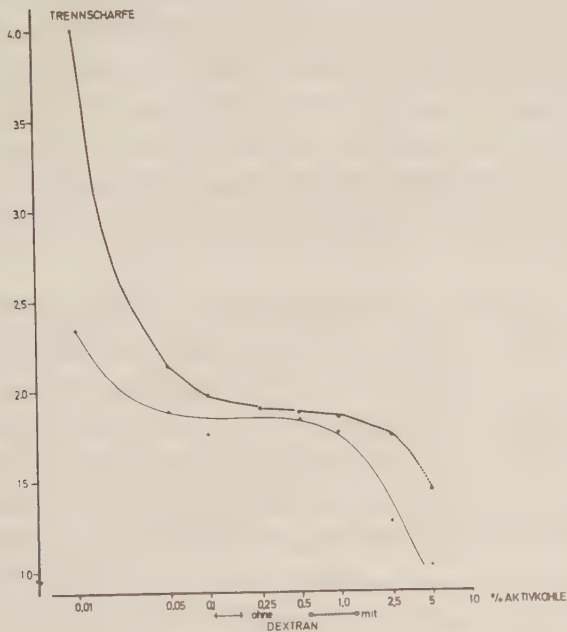


Abb. 8: "Trennschärfekurven": Darstellung der Trennschärfe ($= \% \text{ Adsorption AG}^* / \% \text{ Adsorption AG}^* - \text{AK}$) als Funktion der Aktivkohlekonzentration.

zu, um dann im Bereich von 1.0 – 0.05% Aktivkohle relativ konstant zu bleiben. Erst bei Konzentrationen unter 0,1 % ist ein erneuter Anstieg der Restaktivität – entsprechend einem Abfall der Adsorptionskurve – zu verzeichnen. (Abb. 7 Adsorptionskurve 3)

2.2. Dextranbeschichtete Aktivkohlebeläßt bei hohen Konzentrationen wesentlich mehr Aktivität im Überstand. Im Bereich von 1.0–0.1 % CH/D ist die Adsorption etwa genau so groß wie mit CH allein. Erst bei extrem geringen Konzentrationen verringert sich die Adsorption von CH/D wieder stärker als die von CH. (Abb. 7 Adsorptionskurve 4)

Interpretation und Bewertung:

In der Adsorption von freiem Aldosteron (AG) weisen beschichtete und unbeschichtete Aktivkohle keine Unterschiede auf. Die geringfügigen Differenzen in den beiden untersten Konzentrationsstufen dürften auf Verdünnungsfehler oder Inhomogenität der Suspension zurückzuführen sein. Die AG-Adsorptionskurven allein lassen noch keinen Vorteil der Dextranbeschichtung erkennen.

Eine eindeutige Interpretation der Adsorption von Radioaktivität in den Proben mit AK-Zusatz ist nicht möglich. Die eventuell naheliegende Erklärung, die AK-Konzentration könnte zu gering gewesen sein, um die vorhandene Menge ^3H -Aldosteron zu binden, kann höchstens einen geringen Teil der Adsorption erklären, denn wären wesentlich mehr als 20% freies Aldosteron im Ansatz verblieben, so hätte die Adsorption mit der 0.01% Konzentrationsstufe ebenfalls höher sein müssen, da diese Aktivkohlemenge ja offensichtlich ausreicht, um ca 98% der im Ansatz vorhandenen Aldosteronmenge zu adsorbieren, wenn es frei vorliegt.

Ein weiteres Argument gegen die Annahme, die Anzahl der AK-Valenzen in den Ansätzen könnte zu gering gewesen sein, das ^3H -Aldosteron quantitativ zu binden, ist die Tatsache, daß nur ca 3000 cpm, entsprechend ca. 30 pg Aldosteron im Ansatz zu binden waren und 30 pg auf einer Eichkurve mit dem gleichen Antiserum nur eine Verdrängung von 1–3% der Radioaktivität bewirken. Es ist also anzunehmen, daß nach der Inkubationszeit in den Ansätzen der Serien II und IV nahezu 100% des Aldosterons proteingebunden waren. Wenn dennoch nicht die gesamte Radioaktivität, sondern nur ein Teil davon nach Adsorbenszugabe im Überstand wiederzufinden ist, so sind hierfür zwei Er-

ärungen möglich:

1. Entweder hat die Aktivkohle durch ihre große Affinität zum Aldosteron – die ja in den Serien I und III demonstriert wird – bereits bestehende Aldosteron-Protein-Komplexe gesprengt ("Stripping-Phänomen") und das so frei gewordene Aldosteron dann adsorbiert, so daß nur der verbleibende proteingebundene Teil der Radioaktivität im Überstand wiedergefunden werden konnte, oder
 2. Aktivkohle adsorbiert nicht spezifisch das "kleine" Hormon, sondern auch die Hormon-Proteinkomplexe ("unspezifische Adsorption").
- Welcher Effekt wirklich ausschlaggebend ist, kann aus diesem Experiment nicht entschieden werden. Fest steht jedoch, daß das Stripping oder die unspezifische Adsorption oder beide Phänomene mit zunehmender Aktivkohlekonzentration ebenfalls zunehmen, der erwünschte Trenneffekt von freiem und proteingebundenem Aldosteron also mit steigender Adsorbenskonzentration immer schlechter wird. Fest steht außerdem, daß Dextran bei hohen Konzentrationen von Aktivkohle (1–5%), und nur dabei, einen gewissen Vorteil mit sich bringt, indem es das Stripping oder die unspezifische Adsorption im Vergleich zu gleichen Konzentrationen unbeschichteter Aktivkohle verringert. Bei Aktivkohlekonzentrationen unter etwa 1% scheint die Dextranbeschichtung keinen Vorteil zu haben.
- Um praktische Schlußfolgerungen für den RIA aus diesem Experiment zu ziehen, sei nochmals an die 1. Idealbedingung der Separationstechnik erinnert: Möglichst vollständige Trennung von B und F. Diesem Ideal nähert sich die Technik dann, wenn das Verhältnis aus der prozentualen Adsorption von freier Radioaktivität zur prozentualen Adsorption von Radioaktivität durch Stripping bzw. unspezifische Adsorption von AG-AK-Komplexen möglichst groß ist. Bildet man aus den korrespondierenden Meßwerten der Kurven 1 und 2, sowie 3 und 4 dieses Verhältnis und trägt die Quotienten als Funktion der Aktivkohlekonzentration auf, so erhält man die beiden in Abb. 5 dargestellten "Trennschärfekurven", aus denen sich leicht die Aktivkohlekonzentrationen mit hoher Trennschärfe ablesen lassen.
- Die Trennschärfe allein genügt aber nicht als Kriterium zur Auswahl einer geeigneten Aktivkohlekonzentration. Es ist zu berücksichtigen, daß der beschrie-

bene Versuch nur mit etwa 30 pg Aldosteron in Form des ^3H -Aldosterons ausgeführt wurde und daß in einer regulären Aldosteron-RIA-Prozedur mit der Anwesenheit von zusätzlich 50-500 pg endogenem Aldosteron/Ansatz zu rechnen ist. Die sehr gute Trennschärfe etwa der 0.002%-igen Aktivkohle könnte nicht zum Tragen kommen, wenn die "Adsorptionskapazität" dieser Adsorbensmenge nicht ausreichte, das freie endogene Aldosteron quantitativ zu binden.

1.1.2.2. Approximierung der Adsorptionskapazität

Zunächst bedarf es einer Definition des Arbeitsbegriffes "Adsorptionskapazität": Darunter soll diejenige Menge freien Aldosterons verstanden werden, die von der zu testenden Menge Adsorbens noch quantitativ (mindestens 99%) adsorbiert wird.

Um die so definierte Adsorptionskapazität für verschiedene Aktivkohlekonzentrationen zumindest näherungsweise zu ermitteln wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Das Adsorptionsverhalten verschiedener Konzentrationen dextranbeschichteter Aktivkohle (0.01, 0.05, 1.0, 2.5 und 5.0%) wurde mit steigenden Mengen inaktiven Aldosterons im Ansatz (0, 44.4, 133.2, 310.8 pg) mit und ohne Antiserumzusatz geprüft. Die Versuchsdurchführung erfolgte genau wie zuvor beschrieben.

Ergebnisse und Interpretation:

1. AG-Adsorptionskurven (Tab. 6, Abb. 9)

Für die 0.01% ige Aktivkohle ist die 99%-"Adsorptionskapazität" bereits durch die Menge radioaktiven Aldosterons (ca. 35 pg) allein deutlich überschritten. 0.05%-ige Aktivkohle adsorbiert dagegen bereits fast 99% des freien Aldosterons.

Bemerkenswert an den Ergebnissen bei diesen beiden Konzentrationen ist die Tatsache, daß in Gegenwart von erheblichen Mengen inaktiven Aldosterons die prozentuale Adsorption der Radioaktivität nicht etwa abnimmt, sondern etwa gleich bleibt bzw. sogar leicht zunimmt, obwohl die Adsorptionskapazität schon mit ca 35 pg ^3H -Aldosteron allein überschritten ist.

Diese Beobachtung macht deutlich, daß ein Unterschreiten der willkürlich gewählten 99% Marke nicht gleichbedeutend ist mit einem absoluten Mangel

Tab. 6 : Versuch zur Approximierung der Adsorptionskapazität verschiedener Aktivkohlekonzentrationen mit Dextransusatz:
 "Aktivkohleadsorptionskurven" in Gegenwart steigender Mengen "inaktiven" Aldosterons in Puffer und Antiserum

A-Kohle Nr.	Konzentr. CH/D(%)	Medium	nur AG* ≈35pg %	AG*+ AG + 44.4 %	AG*+ AG +133.2 %	AG*+AG +310.8pg %
% ADSORPTION -----						
SERIE I						
x 2	CH/D-12 0.01	Puffer	68.19	70.47	72.97	73.36
x 2	CH/D-11 0.05	"	98.35	98.31	98.38	98.57
x 2	CH/D-7 0.25	"	99.77	99.80	99.77	99.73
x 2	CH/D-5 1.0	"	99.91	99.92	99.94	99.90
x 2	CH/D-3 2.5	"	99.98	99.93	99.96	99.93
x 2	CH/D-1 5.0	"	100.0	99.99	99.98	99.99
SERIE II						
x 2	CH/D-12 0.01	Antiserum	15.15	22.50	32.20	48.57
x 2	CH/D-11 0.05	"	34.68	44.54	62.00	76.32
x 2	CH/D-7 0.25	"	43.33	52.54	67.07	80.46
x 2	CH/D-5 1.0	"	52.19	57.88	70.76	83.49
x 2	CH/D-3 2.5	"	54.16	59.52	73.51	84.69
x 2	CH/D-1 5.0	"	65.15	69.91	78.93	87.89

AG* = 100% ³H-Aldosteron : 3036.5 cpm ≈ ca 35 pg
 AG = Aldosteron

Tab. 7 : Zunehmende Tendenz der Adsorptionsdifferenzen mit geringer werdender Aktivkohlekonzentration. Errechnet aus den Ergebnissen von Tab. 6

Konzentr. CH/D (%)	ADSORPTIONSDIFFERENZEN					
	%A _{44pg}	-%A _{opg}	%A _{130pg}	-%A _{opg}	%A _{310pg}	-%A _{opg}
	%	%	%	%	%	%
0.01	7.35		7.05		33.42	
0.05	9.86		27.32		41.64	
0.25	9.21		23.74		37.13	
1.0	5.69		18.57		31.30	
2.5	5.36		19.35		30.53	
5.0	4.76		13.78		22.74	

an Aktivkohle. Vielmehr reicht nur der offensichtlich noch bestehende Überschuß an Aktivkohle-Adsorptionsvalenzen nicht mehr aus, um das Gleichgewicht der Reaktion



quantitativ auf die rechte Seite zu verschieben. Daraus ist zu folgern, daß mit 500 µl 0.05%-iger Aktivkohle durchaus noch zufriedenstellende Trennungen von bis zu ca 300 pg inaktiven Aldosterons durchgeführt werden können, ohne daß wesentliche Schwankungen der Adsorptionsquote zu befürchten wären.

Die praktische Bedeutung dieser Feststellung ergibt sich im Zusammenhang mit dem Ergebnis des vorangegangenen Versuches, in dem für die 0.05%-ige Aktivkohle die vergleichsweise hohe Trennschärfe von 2.249 nachgewiesen werden konnte.

Steigert man die Aktivkohlekonzentration von 0.25% auf 5% so wird dadurch das Gleichgewicht der obigen Reaktion nur noch geringfügig weiter nach rechts verschoben (0.2-0.3% zusätzliche AG-Adsorption). Dieser Zugewinn an "spezifischer" Adsorption steht aber in keiner Relation zu dem Nachteil, der durch das zugleich erheblich stärker ansteigende unerwünschte Stripping hervorgerufen wird (21.82% Strippingzunahme).

2. Adsorptionskurven von Ansätzen mit Antiserum (Tab. 6, Abb. 9)

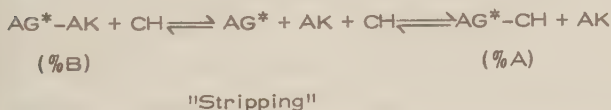
Die Adsorptionskurve 1 der II. Serie mit Antiseruminkubation und ohne Zusatz inaktiven Aldosterons verläuft erwartungsgemäß ähnlich derjenigen im vorangegangenen Versuch: Anstieg im untersten Konzentrationsbereich, Plateau im mittleren Bereich und abermaliger Anstieg bei großen Aktivkohlekonzentrationen. Die Adsorptionskurven 2-4 mit 44.4, 133.2 und 310.8 pg Zusatz inaktiven Aldosterons sind nach oben verschoben, das heißt die prozentuale Adsorption von Radioaktivität erhöht sich in Gegenwart von erhöhten Mengen inaktiven Aldosterons, was ja gleichbedeutend ist mit der erwarteten Abnahme proteingebundenen ³H-Aldosterons im Überstand durch die kompetitive Verdrängung des AG* vom AK.

Bei allen Adsorptionskurven mit Antiserumzusatz läßt sich eine Gliederung

in drei Abschnitte erkennen:

- a) einen "Anstiegsbereich" bei sehr geringen Aktivkohlekonzentrationen, der etwa dem Anstieg der Adsorptionskurve in Gegenwart von AG* allein entspricht.
- b) einen "Proportionalitätsbereich"(Plateau), in dem das Verhältnis von adsorbiertem AG* zur Adsorption in Gegenwart von AK weitgehend konstant ist. Stripping bzw. unspezifische Adsorption halten sich hier in Grenzen.
- c) einen eigentlichen "Strippingbereich", in dem ein erneuter, vermutlich durch Überhandnehmen des Stripping bedingter, steiler Anstieg der Adsorptionskurven erfolgt.

Der Adsorption des ³H-Aldosterons liegen zwei Gleichgewichtsreaktionen zu Grunde. Während die Adsorptionskurve 1 ohne Zusatz "inaktiven" Aldosterons die dem Aktivkohle-System immanente unerwünschte, durch das nachfolgende Gleichgewicht bedingte Adsorption repräsentiert



wird die erhöhte Adsorption der Adsorptionskurven 2-4 zusätzlich durch die kompetitive Verdrängung von AG* nach der RIA-Grundreaktion bedingt:



Eine weitere interessante Tatsache am Ergebnis dieses Versuches wird deutlich beim Vergleich der Abstände der Adsorptionskurven 1-4 bei verschiedenen Aktivkohlekonzentrationen: Es fällt auf, daß der Anstieg von %A auf Grund einer bestimmten Menge "inaktiven" Aldosterons deutliche Unterschiede aufweist, das heißt die Kurven verlaufen nicht parallel. Aus Tab. 7 wird ein systematischer Anstieg der Adsorptionsdifferenzen (z.B. %A_{0 pg} - %A_{44.4 pg}) von hohen zu niedrigen Aktivkohlekonzentrationen bis 0.05% deutlich. Dies ist gleichbedeutend mit der Feststellung, daß eine lin-lin-Eichkurve (%B = f(Dosis)) im Bereich von 0 - 310.8 pg Aldosteron bei Verwendung schwach konzentrierter Aktivkohlesuspensionen steiler verläuft als Eichkurven, die mit konzentrierterer Aktivkohle erstellt wurden.

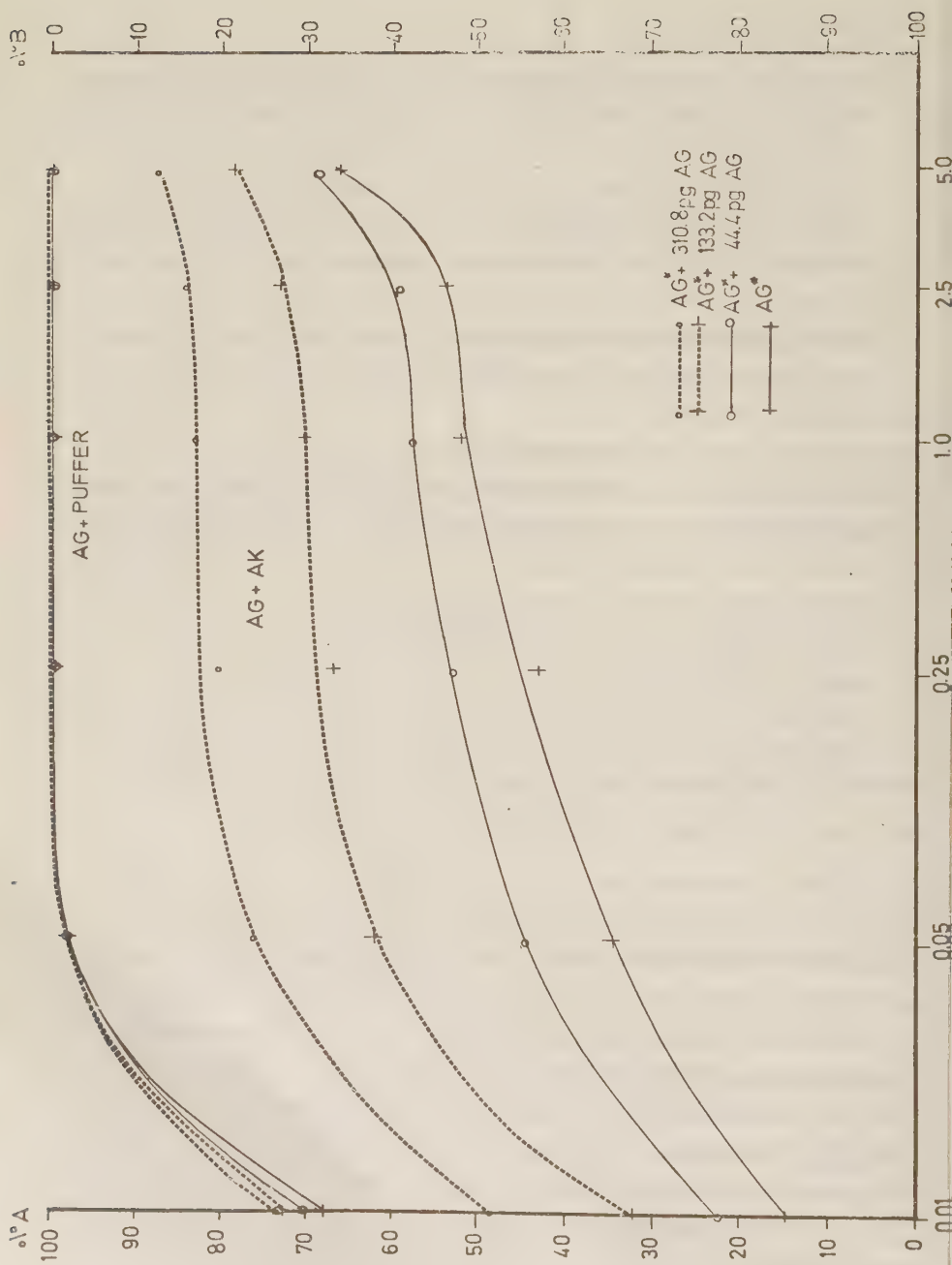


Abb. 8: Adsorption von $^3\text{H-Al}^{+3}$ auf...

Für präzise Messungen im Bereich von ca. 0–310 pg empfiehlt sich also bei Verwendung von 500 µl 0.05%-ige Aktivkohle als optimale Adsorbenskonzentration. (Abb. 10)

Eine weitere versuchstechnische Verbesserung der Präzision ließe sich erzielen, indem man die gleiche Menge Aktivkohle (0.5 mg) in einem kleineren Volumen, etwa 100 µl 0.25%-ige Suspension, unterbringt und dann 500 µl von insgesamt 600 µl – mithin 5/6 statt bisher 1/2 des Überstandes – zur Messung bringt. Dadurch müßte sich bei gleicher Meßzeit die Zählabweichung bei Mehrfachbestimmungen verringern und somit Präzision und Sensitivität des Assays weiter verbessern lassen.

1.1.2.3. Vergleich von Eichkurven bei Verwendung unterschiedlicher Mengen Aktivkohle

Auf Grund der im vorangehenden Abschnitt diskutierten Ergebnisse konnte angenommen werden, daß Eichkurven bei Verwendung geringerer Aktivkohlemengen unter sonst gleichen Versuchsbedingungen steiler verlaufen, als bei Verwendung der meistens üblichen 1.6%-igen Aktivkohle.

Darüberhinaus sollte die Möglichkeit geprüft werden, durch Zugabe eines geringeren Volumens an Aktivkohlesuspension den Anteil des zur Messung herangezogenen Überstandes zu erhöhen, um die Zählausbeute zu verbessern.

Versuch:

Es wurden zwei Eichkurven mit je drei Dosispunkten angelegt: Eine Kontrolleichkurve wurde wie üblich mit 500 µl 1.6%-iger dextranbeschichteter Aktivkohle (8 mg), eine Testeichkurve mit 100 µl 0.25%-iger dextranbeschichteter Aktivkohle (0.25 mg) erstellt. Diese Menge wurde gewählt, weil in den vorangehenden Versuchen eine optimale Relation zwischen Trennschärfe und Adsorptionskapazität für eben diese Aktivkohlemenge nachgewiesen wurde. Ergebnis: (Tab. 8, Abb. 11)

Die Testeichkurve mit 100 µl 0.25%-iger CH/D liegt insgesamt deutlich höher als die Kontrolleichkurve; Der Anteil gebundenen Aldosterons ist also größer, was hauptsächlich auf das in Versuch 1.1.2.1. nachgewiesene geringere Stripping zurückzuführen sein dürfte. Die Testeichkurve verläuft im gesamten Bereich von 44 – 440 pg, insbesondere aber zwischen 44 und

88 pg steiler als die Vergleichseichkurve. Diese ist lediglich im Bereich zwischen 0 und 44 pg etwas steiler als die Testeichkurve. Die "theoretische Sensitivität" der Testeichkurve ist mit 21.6 pg geringer als die der Kontrollleichkurve (8.0 pg). Die Korrelationskoeffizienten der Logit-Log-Transformation sind bei beiden Kurven gleichermaßen gut (0.999 und 0.998). Auch für die Präzision ließ sich beim Vergleich der Variationskoeffizienten korrespondierender Kurvenpunkte im gepaarten T-Test kein signifikanter Unterschied feststellen ($p > 0.7$).

Auswertung:

Mit 100 μ l 0.25%-iger CH/D läßt sich eine gute Eichkurve erstellen, die über große Bereiche sogar steiler verläuft als eine mit 1.6%-iger CH/D gewonnene Eichkurve. Die zum Teil etwas höheren Variationskoeffizienten der Testeichkurve sind wahrscheinlich durch experimentelle Fehler bedingt: Beim Pipettieren von 500 μ l aus 600 μ l Überstand wird leicht etwas Aktivkohle mitgerissen. Es empfiehlt sich deshalb besser mit 0.2 ml Aktivkohlesuspension zu arbeiten, um diese experimentellen Fehler, die den potentiellen Gewinn an Präzision durch die steilere Eichkurve und die bessere Zähl- ausbeute leicht überwiegen können, möglichst gering zu halten.

Auch die geringere Sensitivität kann primär auf diesen experimentellen Fehler zurückgeführt werden, denn die Steilheit der beiden Eichkurven im Bereich von 0 - 22.2 pg - ausgedrückt durch die %B-Differenz - ist nahezu identisch, der Variationskoeffizient der Testkurve bei 0 pg mit 3.76% aber fast 2.5 mal so groß wie der Variationskoeffizient der Kontrollkurve bei 0 pg (1.67%). Da in die Berechnung der theoretischen Sensitivitätsgrenze einerseits die Steilheit der Eichkurve in der Umgebung von 0 pg und andererseits der Variationskoeffizient bei 0 pg eingeht, erstere aber in beiden Fällen praktisch identisch ist, wird der Zusammenhang des 2.5 fach erhöhten Variationskoeffizienten der Testeichkurve mit der 2.5 fach reduzierten Sensitivität offensichtlich. Hinzu kommt, daß die Testeichkurve nicht mit dem für diese Aktivkohlekonzentration bestimmten optimalen Titer, sondern bei einem %B₀ = 58 gegenüber %B₀ = 46 der Kontrollleichkurve ausgeführt wurde. Dieser "falsche Titer" kann seinerseits zur Verminderung der Sensitivität beigetragen haben. Da der erhöhte Variationskoeffizient mit

großer Wahrscheinlichkeit dem experimentellen Pipettierfehler anzulasten ist, darf für die Eichkurve mit reduzierter Aktivkohlemenge prinzipiell die gleiche theoretische Sensitivität wie für die Kontrolleichkurve angenommen werden.

Tab. 8 : Vergleich einer Eichkurve, die mit reduzierter Aktivkohlemenge erstellt wurde, mit einer Kontrolleichkurve

Kontrolleichkurve: 500 µl 1.6% CH/D $\hat{=}$ 8.0 mg					Testeichkurve: 100 µl 0.25% CH/D $\hat{=}$ 0.25 mg			
P	pg	%B	V(%)	$\%B_{pn} - \%B_{p(n-1)}$ (Steilheit)	%B	V(%)	$\%B_{pn} - \%B_{p(n-1)}$ (Steilheit)	
1	0	46.16	1.67	-	58.17	3.76	-	
2	22.2	41.88	1.88	4.28	53.71	2.26	4.46	
3	44.4	37.14	2.02	4.74	50.03	3.11	3.68	
4	88.8	31.01	0.80	6.13	40.65	0.77	9.38	
5	133.2	25.86	1.85	5.15	34.73	1.31	5.92	
6	177.6	22.17	1.89	3.69	30.93	3.04	3.80	
7	222.0	18.77	10.06	3.40	27.29	3.66	3.64	
8	444.0	11.89	3.18	6.88	17.96	1.90	9.43	

Gleichung der

Logit-Log-Transf.

Logit y = D ln x + Z

$\%B_{P-1} - \%B_{P-8}$

Sensitivität:

D 5.6977

Z -2.5677

R -0.9994

= 34.27 %

8.07 pg

D 5.9892

Z -2.5994

R -0.9981

= 40.31 %

21.66 pg

Bei den hier im Zusammenhang dargestellten Ergebnissen über das Adsorptionsverhalten von Aktivkohle mußte zum Teil von Voraussetzungen ausgegangen werden, die erst auf Grund von Ergebnissen aus weiteren methodischen Entwicklungen begründet werden können. Dies gilt für die Bestimmung der "Stripping-Kurven", die erst nach Kenntnis des Antiserumtiters erstellt werden konnten, ebenso wie für die dabei gewählten Inkubationsbedingungen. Die Bestimmung des Antiserumtiters setzt aber andererseits eine funktionier-

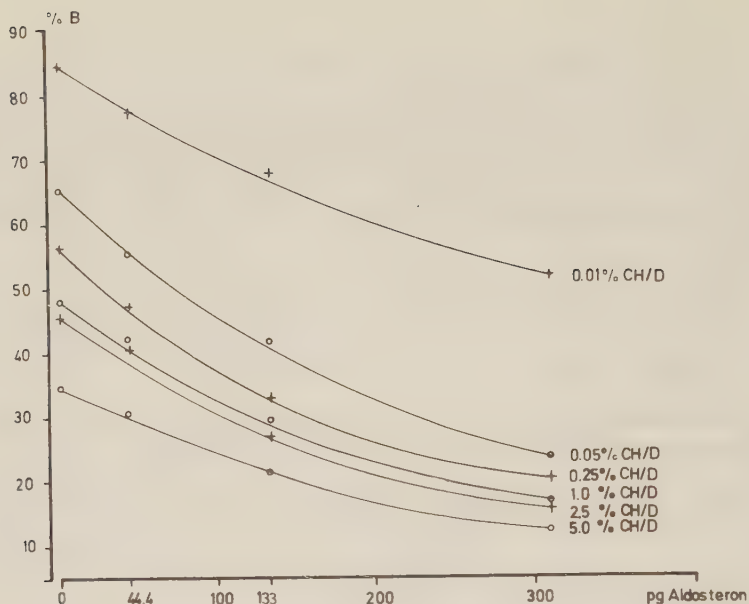


Abb. 10: Einfluß der Aktivkohlekonzentration auf die Steilheit der Eichkurve.

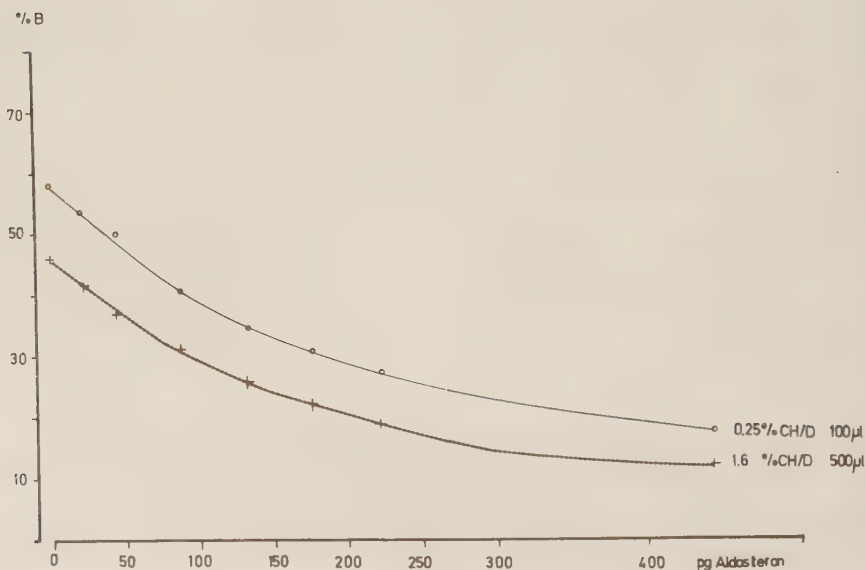


Abb. 11: "Titeranstieg" und steilerer Eichkurvenverlauf durch Verwendung von schwach konzentrierter Aktivkohlesuspension zur Trennung von B und F.

ende Technik zur Trennung von B und F voraus, wie die fehlgeschlagenen Versuche zur Titerbestimmung mit Florisil beweisen.

Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoll, die Adsorbensauswahl am Beginn der methodischen Entwicklungen zu beschreiben. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Auswahl der 1,6%-igen dextranbeschichteten Aktivkohle für die weiteren Untersuchungen ohne den gesamten Erkenntnisstand der zuvor geschilderten Experimente erfolgen mußte. Daß diese Adsorbenskonzentration zu zuverlässigen Resultaten führt, ist auf Grund der Adsorptionsversuche durchaus zu erwarten und bestätigt sich bei der Prüfung der Zuverlässigkeitskriterien für die Methode.

1.2. Das Antiserum

1.2.1. Herkunft

Aldosteron-Antiserum wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. P. Vecsei Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Es wurde gegen einen Aldosteron-21-hemisuccinat-Rinderalbumin-Komplex in einem Schaf gezüchtet.

Die erste Charge von 0,5 ml wurde seit Beginn dieser Untersuchungen im Spätsommer 1972 bis derzeit im November 1974 verwendet. Im Oktober 1974 erhielten wir eine zweite Charge à 0,5 ml des gleichen Antiserums. Einzelheiten über die Spezifität sind in Abschn. 2.1.2.1. wiedergegeben.

1.2.2. Lagerung des Antiserumvorrats

Die beiden Chargen wurden tiefgefroren (-20°C) übernommen und nach Erhalt aufgetaut, mit 0,05 M Borat-Puffer pH 8 mit 0,06% γ -Globulin-Zusatz (Reag. Nr. 1) 1:1000 verdünnt und in 500 μl Portionen sofort wieder bei -20°C tiefgefroren.

Das Globulin fungiert nach übereinstimmender Ansicht vieler Autoren (MAYES, 1970; LEYENDECKER, 1972) als protektives Protein für das Antiserum. Es soll das Antiserum gegenüber Lösungsmittelleffekten (LEYENDECKER, 1972) schützen und vermindert andererseits die zerstörende Wirkung der Aktivkohle auf den Steroid-Protein-Komplex - Stripping - (BINOUX, 1972).

Das Portionierungsvolumen des Antiserumvorrates wurde so gewählt, daß die Menge bei weiterer Verdünnung auf den Arbeitstiter gerade so viel Arbeitslösung ergibt, wie für eine Serie benötigt wird.

Beispiel: Nehmen wir an, eine Serie bestehe aus 150 Inkubationsansätzen, der aktuelle Arbeitstiter betrage 1: 150 000. Es werden also 75 ml einer 1: 150 000 verdünnten Arbeitslösung gebraucht. Die darin enthaltene Antiserummenge ist in 500 μ l 1: 1 000 verdünnter Vorratslösung enthalten.

1.2.3. Bestimmung des Antiserumtiters

Titerbestimmungen müssen zu Beginn bei Verwendung eines neuen Antiserums und dann in mehrmonatigen Abständen immer dann, wenn $\%B_0$ der Eichkurven wesentlich absinkt, durchgeführt werden, um die Qualität des Antiserums zu überprüfen und den aktuellen Titer zu ermitteln.

Wichtig bei der Dokumentation von Titerbestimmungen ist neben dem Titer selbst die Angabe mit welcher Konzentration welchen Adsorptionsmittels die die Antiserumverdünnungskurve ermittelt wurde. Diese Forderung ergibt sich aus den beiden Eichkurven in Abb. 11. Beide Kurven wurden mit dem gleichen Antiserumtiter von 1: 100 000 erstellt: $\%B_0$ ist aber bei Verwendung von 0.25%-iger Aktivkohle 58.17% gegenüber 46.16% mit 1.6%-iger Aktivkohle. Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß sich die Eichkurve mit der schwächerkonzentrierten Aktivkohle bei Verwendung eines höheren Antiserumtiters nach unten verschiebt, $\%B_0$ sich also dem optimalen Arbeitstiter von ca 50% nähert. Vergleichbarkeit der Titerbestimmungen erfordert weiterhin, daß im Reaktionsgleichgewicht gemessen wird.

Methode: Es wird jeweils eine Verdünnungsreihe des Antiserums mit n (=etwa 10) verschiedenen Konzentrationen von 1:1 000 bis 1: 300 000 oder 1: 500 000 angelegt. Als Verdünnungsmedium dient wiederum γ -Globulin-Puffer(Reag.Nr. 1.). Als Reaktionspartner für das Antiserum werden in 3 n + 3 Eppendorf-Reaktionsgefäße je ca 3000 cpm 3H -Aldosteron pipettiert und bei 37°C im Luftstrom eingedampft. 3 Ansätze werden mit je 1 ml aqua dest. aufgefüllt und für die genaue Messung der zugesetzten 3H -Aldosteron-Menge(100 $\% ^3H$ -Aldo) vorgesehen. Die übrigen Ansätze werden mit je 500 μ l verschiedener Antiserumkonzentrationen(je 3 Ansätze pro Antiserumkonzentration) über Nacht - ca. 18 h - bei 4°C inkubiert, dann B und F in der

zuvor beschriebenen Weise mit 1.6% dextranbeschichteter Aktivkohle getrennt und die Aktivität in 500 µl Überstand im Flüssigszintillationszähler gemessen. Die ermittelten Radioaktivitäten werden nach Gl. 4 in % der anfangs zugesetzten Gesamtradioaktivität umgerechnet:

$$\text{Gl. 4: } \frac{\text{Meßwert (cpm)} \times 100}{100 \% (\text{cpm})} = \%B \text{ (\% gebundene Radioaktivität)}$$

Die %B-Werte werden als Funktion der Antiserumverdünnung gezeichnet.

Die so erhaltenen Kurven nennen wir Antiserumverdünnungskurven.

Die Festlegung der Arbeitskonzentration erfolgt entsprechend den im theoretischen Teil durchgeführten Überlegungen durch Aufsuchen derjenigen

Antiserumverdünnung, die in Abwesenheit "inaktiven" Aldosterons gerade 50% ³H-Aldosteron bindet. Diese Verdünnung wird in Zukunft kurz als

"Titer" bezeichnet.

Die definitive Auswahl der Antiserum - Arbeitsverdünnung erfolgt durch

Vergleich mehrerer Eichkurven, die mit verschiedenen Antiserumverdünnungen erstellt werden. (z.B. 1: 100 000, 1: 140 000, 1: 150 000, 1: 160 000)

Ergebnisse: (Tab. 9a/b)

Tab. 9 a : Antiserumverdünnungskurve am 24. 10. 74

Antiserum: Aldosteron-Antikörper-Vecsel

Charge: II

Adsorptionsmittel: 500 µl 1.6%-ige dextranbeschichtete Aktivkohle

Adsorptionszeit: 30 min

Antiserumtiter	%B
1: 1 000	77.61
1: 10 000	64.75
1: 50 000	54.05
1: 100 000	43.40
1: 125 000	34.72
1: 150 000	32.19
1: 175 000	27.54
1: 200 000	24.54

Titer: 1: 68 000

Wiederholte Titerbestimmungen haben gezeigt, daß das von uns verwendete Aldosteron-Antiserum einen hohen absoluten Titer besitzt, aber im Laufe von 1-2 Jahren bei der geschilderten Lagerungsweise einen deutlichen Titerabfall

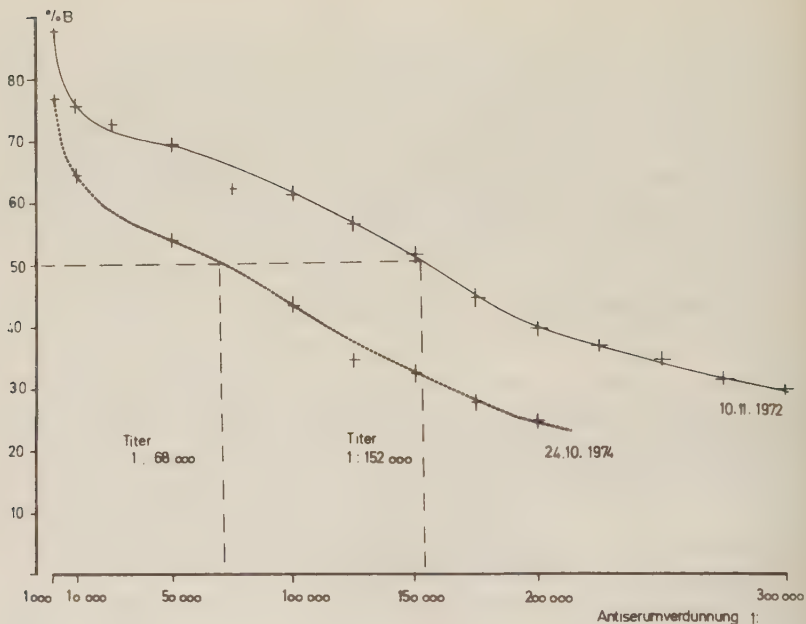


Abb. 12: "Antiserumverdünnungskurven": Titerbestimmungen bei einem Aldosteron-Antiserum im Abstand von 2 Jahren
 Adsorbens: 500ul 1.6% Aktivkohle mit Dextran; n=3/Dosispunkt

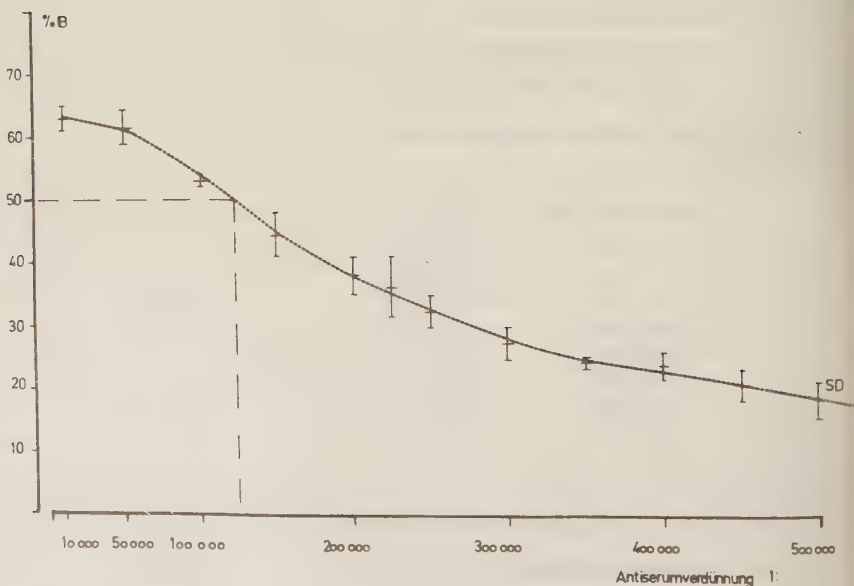


Abb. 13: "Antiserumverdünnungskurve": Mittelwerte und SD aus drei in kurzem zeitlichen Abstand wiederholten Serien.

litt. Dies wird in der Abb. 12 deutlich, in der zwei Antiserumverdünnungskurven abgebildet sind, die mit dem gleichen Antiserum im Abstand von etwa zwei Jahren ermittelt wurden.

Abb. 9 b : Antiserumverdünnungskurven

Antiserum: Aldosteron-Antikörper-Vecsei

Charge: I

Absorptionsmittel: 500 µl 1.6%-ige dextranbeschichtete Aktivkohle

Absorptionszeit: 30 min

Antiserum- titer	Serie I 6. 11. 72		Serie II 7. 11. 72		Serie III 10. 11. 72		MW	± SD	VK
	%B	n	%B	n	%B	n	n		%
1 000	—	—	—	—	87.8	3	—	—	—
10 000	63.5	2	63.2	3	75.6	3	63.28	5 2.13	3.37
25 000	—	—	—	—	72.7	3	—	—	—
50 000	59.9	2	62.6	3	69.6	3	61.48	5 2.80	4.73
75 000	—	—	—	—	62.4	3	—	—	—
100 000	52.8	3	54.0	2	61.3	3	53.33	5 1.17	2.21
125 000	—	—	—	—	56.3	3	—	—	—
150 000	42.1	3	48.0	2	51.4	3	44.42	5 3.51	7.91
175 000	—	—	—	—	44.2	3	—	—	—
200 000	34.8	3	41.1	2	39.4	3	38.11	8 2.86	7.51
225 000	—	—	—	—	36.3	3	—	—	—
250 000	29.8	3	33.9	2	34.1	3	32.42	8 2.44	7.53
275 000	—	—	—	—	30.9	3	—	—	—
300 000	24.3	3	29.8	2	29.1	3	27.45	8 2.80	10.2
350 000	24.3	3	32.3	2	—	—	—	—	—
400 000	21.4	3	25.8	3	—	—	23.61	6 2.42	10.25
450 000	19.0	3	23.2	2	—	—	20.66	5 2.38	11.52
500 000	14.9	3	21.4	3	—	—	18.18	6 3.76	20.67
Titer:	1:		1:		1:		1:		
	110 000		130 000		152 000		125 000		

Im November 1972 wurde der Titer mit 1: 110 000 bis 1:152 000 im Oktober 1974 nur noch mit 1: 68 000 bestimmt. Daß dieser Unterschied mit Sicherheit nicht auf mangelnde Reproduzierbarkeit der Antiserumverdünnungskurven zurückzuführen sein kann, machen die Ergebnisse wiederholter Titerbestimmungen in kurzen zeitlichen Abständen deutlich. In Abb. 13 wurden die Mittelwerte aus drei aufeinanderfolgenden Titerbestimmungen und die dazugehörigen Standardabweichungen aufgetragen. Der mittlere ermittelte Titer lag zu diesem Zeitpunkt bei 1: 125 000.

1.2.4. Haltbarkeit von Antiserum-Arbeitslösungen

Die auf den aktuellen Titer eingestellten Arbeitslösungen wurden grundsätzlich am Tag der Verwendung neu angesetzt. Von ST. CYR (1972) wird die Ansicht vertreten, daß Antiserum-Verdünnungen auch flüssig bei Kühlschranktemperaturen über längere Zeit haltbar sind. GANGULI (1971) berichtet dagegen über größere Verluste der Antikörperaktivität schon nach 72 Stunden Lagerung einer 1:500 Verdünnung eines Gastrin-Antiserums bei 4°C. Um zu überprüfen, ob sich der Titer unseres Antiserums nach dem Auftauen durch einige Tage Lagerung bei + 4°C im Kühlschrank verändert, wurden mit einer einmal angesetzten Arbeitslösung an sechs aufeinander folgenden Tagen Eichkurven erstellt.

In den ersten drei Tagen ließ sich keine über die übliche Schwankungsbreite an verschiedenen Tagen erstellter Eichkurven hinausgehende Veränderung des Titers oder der Eichkurve insgesamt nachweisen. Die Eichkurven des 4. bis 6. Tages nach dem Auftauen des Antiserums zeigten dagegen eine deutliche Verminderung des gebundenen Aldosterons im gesamten Eichkurvenbereich: %B₀ am 5. Tag: 44,8 % gegenüber 51,1 % am Tag des Auftauens. (Tab.

Tab. 10 : Verwendung einer einmal aufgetauten Antiserum-Arbeitslösung für Eichkurven an sechs aufeinander folgenden Tagen

Dosis	Auftautag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
		-	% B -			
0.0	51.08	49.49	51.04	47.17	44.78	45.83
22.2	44.48	42.89	43.75	39.29	38.61	39.80
44.4	37.88	37.99	39.83	34.81	33.59	34.59
66.6	33.57	-	34.48	30.10	-	28.86
88.8	-	30.35	-	-	26.68	-
111.0	26.71	-	27.30	25.23	-	24.96
133.2	-	24.93	-	-	21.98	-
155.4	22.53	-	21.95	20.38	-	20.06
177.6	-	20.08	-	-	18.37	-
222.0	17.75	17.70	18.30	16.59	16.72	14.15
266.4	15.24	14.78	15.94	13.98	-	-

Auftautag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
-2.51	-2.52	-2.47	-2.28	-2.38	-2.44
5.24	5.32	5.22	4.75	5.03	5.13
-0.9995	-0.9989	-0.9972	-0.9983	-0.9996	-0.9970

$$\log y = D \ln x + Z$$

Abb. 14 ist die Verschiebung der Eichkurven ab dem 4. Tag nach dem Auftauen des Antiserums deutlich. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen GÄNGULI(1971) und HURN(1971).

halten daher das Auftauen des Antiserums unmittelbar vor Gebrauch die beste Lösung. Gegen eine Verwendung im Kühlschrank aufbewahrter dünnter Arbeitslösungen bis zu 72 Stunden nach dem Auftauen ist aber nichts einzuwenden.

3. Auswahl und Erprobung geeigneter Incubationsbedingungen

3.1. Das experimentelle System für den RIA

Beginn der Experimente stand die Überlegung in welchem Gerätesystem die eigentliche RIA ausgeführt werden sollte. Wichtigste Anforderung an ein solches System ist multifunktionelle Verwendbarkeit. Die wesentlichen Einzelanforderungen, die ein Assay-System erfüllen muß, sind nachfolgend den Leistungen der von uns verwendeten "Eppendorf-Systeme" gegenübergestellt.

Anforderung:	Leistung des Eppendorf-Systems
hohe Probenkapazität	24 Ansätze pro Tablett
Anzahl der Ansätze	Heizblock für 24 Ansätze kombiniert mit einem Eindampfrechen nach Lommer
Schütteln	Rotationsmischer für 24 Ansätze
Zentrifugieren	Eppendorf-Zentrifuge (16 000 U/min) für 12 Assaygefäße. Nachteil: Proben müssen einzeln eingesetzt werden
Assaygefäße	Eppendorf Nr. 3810
gut reproduzierbares Volumen	max. 2 ml
Verschließbarkeit	Klappdeckel
Gefäßmaterial	Polystyrol: nachteilige Effekte des Plastikmaterials auf den Assay konnten nicht festgestellt werden

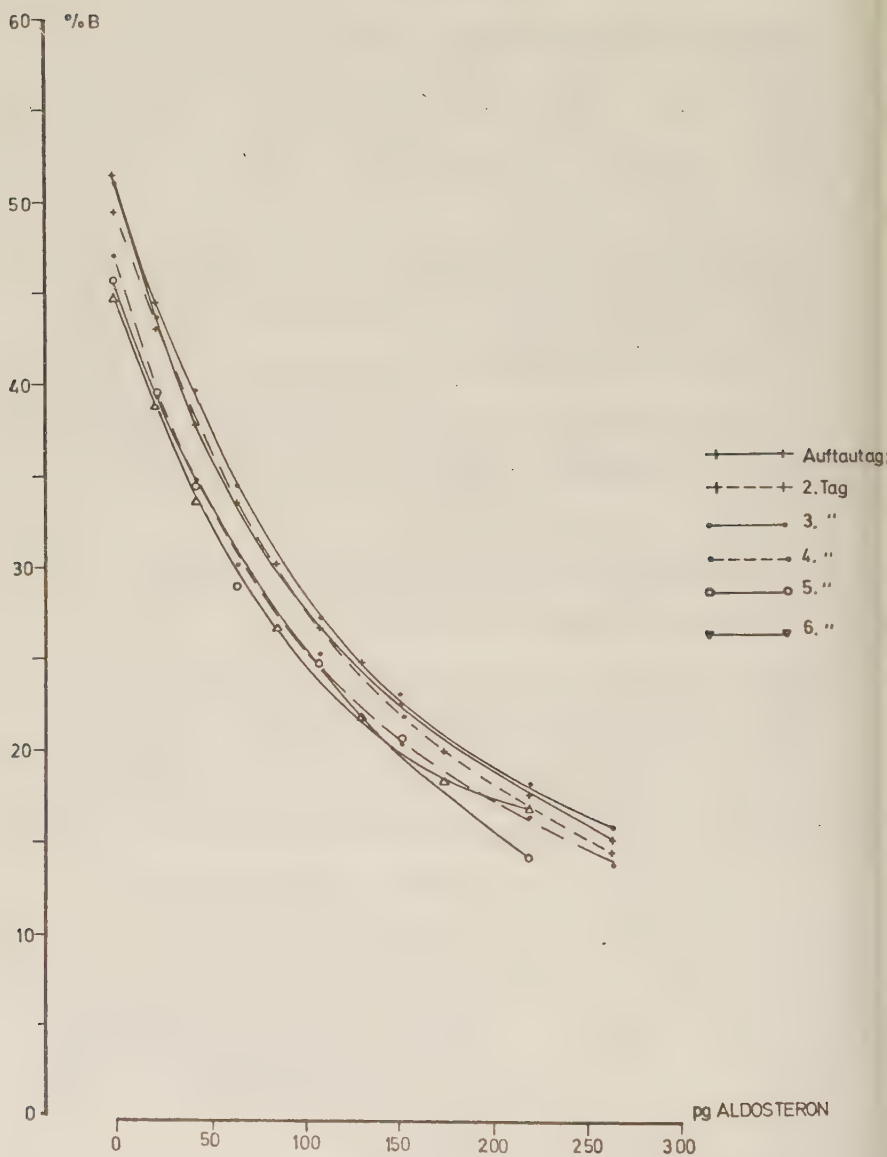


Abb. 14: Eichkurven, die mit Antiserumarbeitslösung erstellt wurden, welche mehrere Tage im Kühlschrank gelagert wurde:
Deutlicher Titerabfall ab 4. Tag.

1.3.2. Inkubationsvolumen

Die Festlegung des Inkubationsvolumens ist eine Sache der Übereinkunft. (vgl. 1, 6.12) Wir entschieden uns für 0.5 ml, weil sich dieses Volumen gut reproduzierbar pipettieren läßt.

1.3.3. Kalkulation der ^3H -Aldosteron-Menge für den RIA

Zwei Forderungen stehen sich bezüglich der für den RIA einzusetzenden Tracermenge gegenüber:

- a) Geringe Tracermenge im Interesse einer hohen Sensitivität
- b) Große Tracermenge im Interesse einer hohen Zählausbeute und damit Präzision

Die Begriffe "gering" und "groß" sind in Relation zur der pro Inkubationsansatz im Normalfall zu erwartenden Hormonmenge zu interpretieren. Diese ist für Aldosteron extrem gering; Sie wurde im Absch. 1,2 bereits mit 125 pg kalkuliert.

Die spezifische Aktivität des uns zur Verfügung stehenden $1,2^3\text{H}$ -Aldosteron (NEN) beträgt etwa 50 Ci/mmol, das Molekulargewicht des Aldosterons 360.45. Somit entsprechen

$$\begin{array}{rcl} 50 \text{ nCi} & \text{ca} & 350 \text{ pg Aldosteron} \\ \text{oder} & 1 \text{ nCi} & \text{ca} \quad 7 \text{ pg Aldosteron} \end{array}$$

Die Aktivität 1 nCi entspricht 2 200 dpm oder ca 800 cpm. Geht man davon aus, daß 1500 cpm in 10 min zuverlässig gemessen werden können, und berücksichtigt man weiter, daß nur ein Teil des Überstandes zur Messung gelangt und die Aktivität im Überstand mit steigender Menge endogenen Aldosterons in der Probe abnimmt, so sind etwa 3 000 cpm ^3H -Aldosteron pro Ansatz erforderlich. Dies entspricht etwa 28.0 pg Aldosteron, also etwa 24 % der kalkulierten Normalmenge Aldosteron im Ansatz. Diese Überlegungen verdeutlichen, wie wichtig eine rigorose Begrenzung der ^3H -Aldosteron-Menge im Interesse einer hohen Sensitivität ist.

1.3.4. Inkubationsmedium

Die Praxis verschiedener Autoren(MAYES, 1970; ITO, 1972; KATZ, 1972; FARMER, 1973) zeigt, daß Inkubationen mit Antiseren in gepuffertem Medium

bei einem pH zwischen 7.0 und 8.0, also in der Nähe des physiologischen pH-Wertes erfolgen sollten. Wir entschieden uns für einen 0.05 m Borat-Puffer pH 8 (Reag. Nr. 1).

Die Gründe für einen Proteinzusatz zum Inkubationsmedium wurden in Abschn. 1.2.2. bereits diskutiert. Ob die Art des verwendeten Proteins – γ -Globulin oder Albumin – für den Erfolg der protektiven Wirkung eine Rolle spielt, ist meines Wissens bisher nicht entschieden. Immerhin zeigen die RIA-Methoden zahlreicher Autoren, daß mit γ -Globulin (MAYES, 1970), mit Albumin (ITO, 1972) als auch mit einer Kombination von beiden (GOMEZ-SANCHEZ, 1972; MARTIN, 1973) zuverlässige RIAs durchgeführt werden können. (vgl. Tab. 1a-c) Auch über die Menge des zu verwendenden Proteins bestehen sehr unterschiedliche Ansichten. Systematische Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Proteinkonzentrationen auf die protektive Wirkung gegenüber dem Strippingeffekt der Aktivkohle in einem HTSH-RIA wurden 1973 von BINOUX et al. publiziert. Nach Ansicht dieser Autoren besitzen hohe Proteinkonzentrationen (2.5–20%) – sie verwenden Serum oder Plasma – den Vorteil, daß mit konzentrierter Aktivkohle gearbeitet werden kann. Ein Vorteil deshalb, weil bei geringen Aktivkohlekonzentrationen ein großer Teil freien ^{125}J -HTSH nicht adsorbiert wird.

Die zuvor berichteten eigenen Ergebnisse über das Adsorptionsverhalten von Aktivkohle gegenüber Aldosteron bei niedrigen Proteinkonzentrationen (0.06% γ -Globulin) lassen dagegen keinen ausgesprochenen Vorteil erkennen, der zur Verwendung stark konzentrierter Aktivkohle Anlaß geben könnte. Unsere Ergebnisse legen im Gegenteil nahe, im Aldosteron-RIA mit geringen Aktivkohlekonzentrationen (0.05% – 500 μl) und geringer Proteinkonzentration (0.06%) zu arbeiten, da diese geringen Aktivkohlekonzentrationen bei gleichzeitig verbesserter Trennschärfe noch nahezu 100%-ige Adsorption des freien Aldosterons gewährleisten.

Dieser Unterschied bestätigt eindrucksvoll die Ansicht, daß die optimalen Parameter für RIAs mit verschiedenen Substanzen jeweils experimentell bestimmt werden müssen.

Auf Grund der guten Erfahrungen mit der niedrigen Proteinkonzentration

verwendeten wir in den weiteren Experimenten grundsätzlich 0,05 m Borat-Puffer mit 0,06%-igem γ -Globulin Zusatz.

In den Inkubationsansatz müssen aber außer der antiserumhaltigen Protein-Pufferlösung noch ^3H -Aldosteron, nicht radioaktives Aldosteron – bei Eichkurvenansätzen – und Aldosteron-haltiges Eluat – bei Proben – eingebracht werden. ^3H -Aldosteron und "kaltes" Aldosteron werden in äthanolischer Lösung aufbewahrt und verwendet, als Elutionsmittel verwenden wir Wasser, in Vorversuchen auch organische Lösungsmittel. In jedem Fall muß das Antiserum in allen Ansätzen im gleichen Volumen des gleichen Mediums gelöst sein. Außerdem soll ein Kontakt zwischen Antiserum und organischen Lösungsmitteln vermieden werden. (LEYENDECKER, 1972) Dies wird am besten dadurch erreicht, daß zuerst ^3H -Aldosteron und Aldosteroneichlösung bzw. Eluat in das Inkubationsgefäß gebracht werden, die Lösungsmittel dann eingedampft werden und erst dann 500 μl des eigentlichen Inkubationsmediums – γ -Globulin Puffer mit Antiserum – zugesetzt werden. Diese Reihenfolge der Zugabe entspricht nach RODBARD(1970) für Gleichgewichtsassays auch den steilsten Eichkurvenverlauf.

1.3.5. Inkubationszeit – und temperatur

Da es sich bei der RIA-Grundreaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt, hängt die Inkubationszeit eng mit der Inkubationstemperatur zusammen.

Zwei prinzipielle Gesichtspunkte sollte man bei der experimentellen Prüfung der Inkubationsbedingungen beachten.

1. Soll die Grundreaktion bis zur Einstellung des Gleichgewichts ablaufen (Gleichgewichts-RIA) oder soll sie bereits vorher gestoppt werden (Ungleichgewichts-RIA) ?
2. Wieviel Zeit darf die Inkubation in Anspruch nehmen und wie kann sie möglichst kurz gehalten werden ?

ad 1) Der Gleichgewichts – RIA hat den Vorteil, daß auch größere Probenkapazitäten technisch problemlos und ohne Zeitdruck bearbeitet werden können, da der genaue Abbruchzeitpunkt der Reaktion nicht kritisch ist.

Beim Ungleichgewichts-RIA muß dagegen entweder die Probenzahl sehr begrenzt werden, oder es müssen aufwendige technische Voraussetzungen gegeben sein, um die Reaktionen in allen Inkubationsansätzen nach gleicher Inkubationsdauer zu stoppen. In jedem Falle erfordert er viel Geschick von Seiten des Experimentators.

Auf die von RODBARD(1970) beschriebenen Vorteile des Ungleichgewichts-RIAs bei verzögerter Tracerzugabe wurde bereits im theoretischen Teil eingegangen. Dieser Vorteil überwiegt jedoch kaum die geschilderten Nachteile des Ungleichgewichts-RIAs.

Wir entschieden uns daher für den Gleichgewichts-RIA.

ad 2) Mit der Entscheidung für den Gleichgewichts-RIA muß man zwangsläufig eine längere Inkubationszeit in Kauf nehmen. Dies muß bei geschickter Zeiteinteilung (Inkubation über Nacht) aber keineswegs einen erhöhten Gesamtzeitbedarf der Methode zur Folge haben.

Bei der Wahl der Inkubationstemperatur ist die Temperaturempfindlichkeit des Antiserums ausschlaggebend. Die Inkubation bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum hat zwar den Nachteil der langsamen Gleichgewichtseinstellung, garantiert jedoch eine höhere Assoziationskonstante und weitgehende Stabilität des Antiserums, wie die in Abschn. 1.2.4. geschilderten Versuche über die Haltbarkeit verdünnter Antiseren bei Kühlschranktemperaturen zeigten.

Die zur Einstellung des Gleichgewichts bei 4°C notwendige Inkubationszeit wurde durch folgenden Inkubationszeitversuch bestimmt:

5 Eichkurvenansätze wurden gleichzeitig inkubiert. Die Reaktionen der fünf Eichkurvenserien wurden dann durch Zugabe von Aktivkohle sukzessive unterbrochen. Die erste nach 30 min, die zweite nach einer Stunde, die dritte nach 3 Stunden, die vierte nach 24 Stunden und schließlich nach 70 Stunden. Das Experiment brachte folgende Resultate. (Tab. 11)

Die Eichkurven werden bei der Darstellung $y = \%B$ und $x = \text{Dosis}$ mit zunehmender Inkubationszeit von links unten nach rechts oben verschoben, d.h. der Anteil gebundenen ^3H -Aldosterons nimmt mit steigender Inkubationszeit zu. (Abb. 12)

Greift man zunächst das Verhalten $\%B_0$ heraus:

Dessen Zunahme ist am ausgeprägtesten zwischen der 30 min Kurve ($\%B_0$ 44.81)

und der 60 min-Kurve ($\%B_0$ 53,01). Der Anstieg in den folgenden 120 min ist bereits deutlich geringer. Die Zunahme beträgt nur noch 5,23% in diesem 4-fach längeren Intervall gegenüber 8,2% in dem ersten Halbstunden-Intervall. Der Anstieg verlangsamt sich dann weiter, doch liegt das 24 Stunden B_0 mit 64,29% nochmals deutlich höher. Nach 24 Stunden ist dann nur noch ein geringfügiger Anstieg der AG-Bindung auch bei extrem langer Inkubationszeit (70 h) nachzuweisen (Abb. 15)

Tab. 11 : Inkubationszeitversuch zur Bestimmung der Gleichgewichtseichkurve

Titer 1: 150 000

Adsorbens: 500 μ l 1,6%-ige dextranbeschichtete Aktivkohle

Dosis Aldo	Inkubationszeit				
	30 min	1 Std.	3 Std.	24 Std.	70 Std.
	- % B -				
0,0	44,81	53,01	58,24	64,29	65,14
25,0	40,06	49,62	52,43	59,76	61,58
50,0	38,62	44,94	48,78	53,02	51,78
100,0	27,71	35,84	38,98	42,15	42,12
250,0	15,44	19,79	21,86	24,21	24,61
500,0	8,92	11,53	12,56	14,32	13,87
D =	-2,888	-3,078	-2,773	-2,938	-3,067
Z =	6,370	6,944	6,203	6,594	6,853
R =	-0,9894	-0,9991	-0,9974	-0,9986	-0,9909

$$\logit y = D \ln x + Z$$

Betrachtung der übrigen Kurvenpunkte zeigt in allen Bereichen die gleiche Anstiegstendenz wie bei $\%B_0$. Auch die Stabilisierung der $\%B$ -Werte ist in allen Bereichen gleich.

Ein augenfälliger Unterschied zwischen dem "niedrig-Dosis" und "hoch-Dosis" Bereich besteht jedoch in der Differenz des $\%B$ nach kurzer und langer Inkubationszeit. Während bei $\%B_0$ (und im niedrigen Dosisbereich) der absolute Unterschied zwischen dem 30-min-Punkt und dem 70-Std-Punkt 20,33% beträgt, ist er bei der Dosis 500 pg nur 4,95%. Relativ (prozentual) betrachtet entsprechen sich diese Anstiege dagegen recht gut, (31% Anstieg bei $\%B_0$ und ca 35% Anstieg bei $\%B_{500}$) was auch aus theoretischen Überlegungen über die Gleichgewichtsreaktion zu erwarten ist.

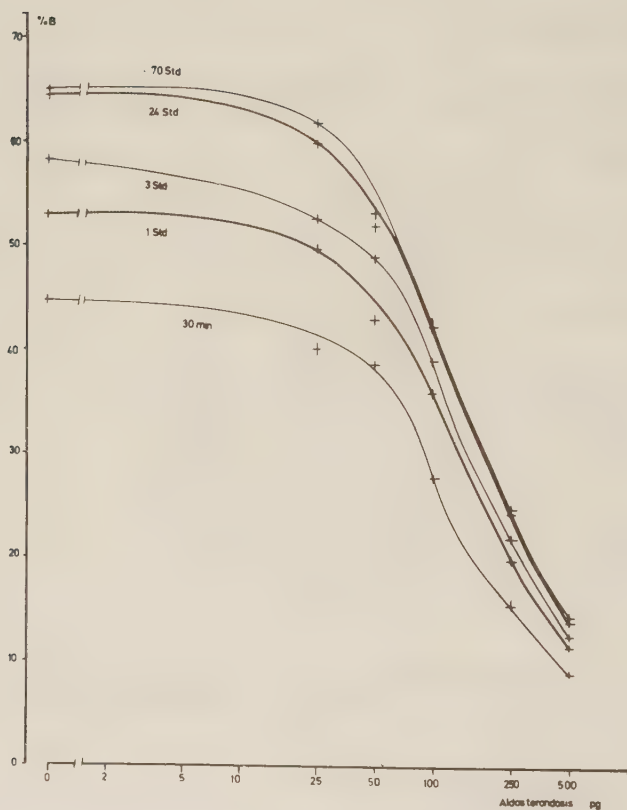


Abb. 15: "Inkubationszeitkurven" in halblogarithmischer Darstellung:
Einfluß zunehmender Inkubationszeit auf den Verlauf der Eich-
kurve des Aldosteron-Radiolimmunoassays

Die Transformation der Eichkurven in die Logit-Log-Form gibt mit Ausnahme der 30-min-Kurve gute Geraden, wenn man einen Korrelationskoeffizienten über 0.99 als Qualitätsmerkmal zu Grunde legt.

Auswertung:

Die Konstanz der Eichkurve über einen längeren Zeitraum ist als Kriterium der Gleichgewichtseinstellung anzusehen. Auf Grund dieses Kriteriums ist anzunehmen, daß sich das Gleichgewicht der RIA-Reaktion nach spätestens 24 Std. Inkubation bei 4°C weitgehend eingestellt hat. Ob das Gleichgewicht tatsächlich vollkommen erreicht ist, läßt sich auf Grund der Abb. 15 nicht sicher entscheiden, doch auch wenn man annimmt, daß der Anstieg des $\%B_o$ von der 24-Std.-Kurve zur 70-Std.-Kurve noch einer tatsächlichen Verschiebung der Grundreaktion zu Gunsten des gebundenen Aldosterons entspricht, ist dies relativ belanglos, weil die Veränderung auch über einen längeren Zeitraum nur sehr gering ist. Diese abnehmende Dynamik der Gleichgewichtseinstellung wurde ja bereits als allgemeines Phänomen bei allen 5 Eichkurven beschrieben.

Die Einstellung des "Beinahe-Gleichgewichts" ist in der Praxis ebenso brauchbar wie das tatsächliche Gleichgewicht, denn entscheidend ist, daß das Reaktionsgleichgewicht während der Zugabe der Aktivkohle in allen Ansätzen konstant bleibt. Diese Bedingung kann spätestens nach 24 stündiger Inkubation, wahrscheinlich aber schon früher als näherungsweise erfüllt angesehen werden, denn die Zeit(Aktivkohle-Pipettierzeit), die während des Abstoppens einer größeren Probenserie vergeht (ca. 10 min) ist vergleichsweise minimal zu der Zeitspanne, die zu einem weiteren meßbaren Anstieg des $\%B_o$ benötigt würde.

Anders ist die Situation in den ersten drei Stunden und insbesondere in der ersten Stunde. Hier haben 10 min Unterschiede, wie sie beim Abstoppen der Reaktion zwischen dem ersten und z.B. 100. Ansatz auftreten können, bereits beträchtliche Differenzen der Aldosteronbindung zur Folge. Die genaue Einhaltung der Inkubationszeit ist also unter Ungleichgewichtsbedingungen kritisch. Die zu Anfang dieses Abschnitts theoretisch diskutierten Probleme des Ungleichgewichts-RIAs werden durch diesen Befund eindrucksvoll unterstrichen.

Eine weitere Überlegung betrifft die möglichen Fehler, die durch ungleichzeitiges Abstoppen der Reaktion in einem Ungleichgewichts-RIA auftreten können. Um diese zu beurteilen, muß man sich nochmals die unterschiedlichen Absolutdifferenzen des $\%B$ im niederen und hohen Dosisbereich vergegenwärtigen. Die Folge hiervon ist, daß ungleichzeitiges Abstoppen der Inkubation im Ungleichgewichts-RIA zu relativ großen Fehlern im niedrigen Dosisbereich aber nur geringen Fehlern im hohen Dosisbereich führt.

Schließlich wirkt sich der ungleiche Zuwachs der Aldosteronbindung in verschiedenen Eichkurvenbereichen auf die Steilheit der Eichkurve aus.

Abb. 15 zeigt die eindeutige Zunahme der Kurvensteilheit mit wachsender Inkubationszeit. Sowohl der "Abstopp-Zeitfehler" als auch die flachere Eichkurve wirken sich nachteilig auf Präzision und Richtigkeit des RIAs aus. Die Schlußfolgerungen aus diesen Erkenntnissen sind:

- Die besten Eichkurven werden bei Anwendung des zuvor beschriebenen Inkubationsschemas im Gleichgewicht erzielt.
- Für die Praxis kann die Gleichgewichtseinstellung zwischen Aldosteron und dem von uns geprüften Antiserum¹ nach 24 Std. Inkubation bei 4 °C als vollständig angenommen werden.

Durch geeignete Darstellung der Inkubationszeitkurven läßt sich das Ausmaß der Gleichgewichtseinstellung für jeden beliebigen Zeitpunkt sowie jedes $\%B$ für den Gleichgewichtszustand genau bestimmen. Trägt man die $\%B_o$ -Werte als Funktion der Inkubationszeit auf, so erhält man eine Kurve nach Abb. 16a, die sich dem Gleichgewichtswert von $\%B_o$ asymptotisch nähert.

Die Ähnlichkeit dieser Kurve mit einer Enzymkinetik veranlaßte uns, eine Linearisierung durch Transformation in die reziproke Form $1/\%B = f(1/t)$ analog einer LINEWEAVER-BURK-Darstellung zu versuchen. Abb. 16 b zeigt eine solche Transformation. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt sich eine der MICHAELIS-Konstante K_m analoge Konstante K_a , deren Kehrwert die Inkubationszeit der halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung angibt. $\%B_{OG}$ (= $\%B_o$ im Gleichgewichtszustand) ergibt sich aus

¹⁾ Die Avidität des jeweiligen Antiserums ist mitentscheidend für die zur Gleichgewichtseinstellung benötigte Zeit.

$\% B_0$

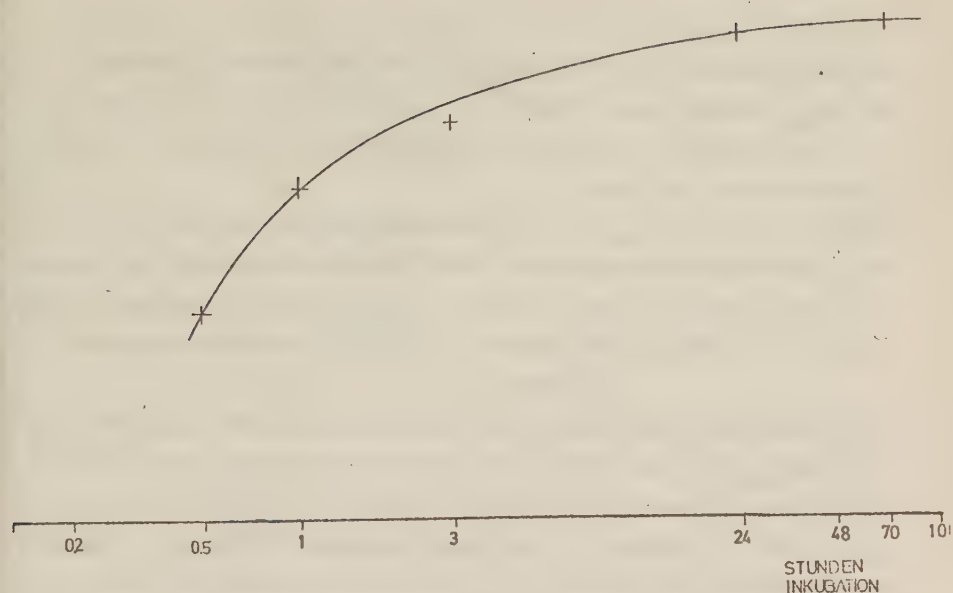


Abb. 16a: Kinetik der Radioimmunoassay-Reaktion dargestellt an Hand der Zunahme von $\% B_0$ nach verschiedenen Inkubationszeiten

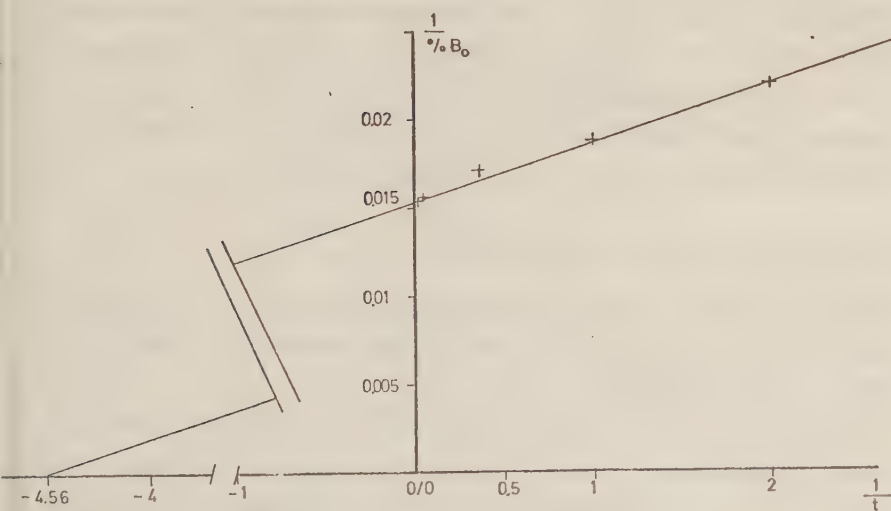


Abb 16b: Transformation der Abb. 16a in die reziproke Form analog einer LINEWEAVER-BURK-Darstellung zur Bestimmung von $\% B_{\max}$ und der halb-maximalen Inkubationszeit (analog K_m)

dem y -Wert am Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ($1/t = 0$, $t = \infty$) durch Bildung des reziproken Wertes. In dem dargestellten Experiment ist $\%B_{OG}$ im Gleichgewicht $1/0.0154 = 64.96 \%$, die Konstante $K_a = 4.56$, die Inkubationszeit zur Einstellung des halbmaximalen $\%B_0$ somit $1/4.56 = 0.219$ Std. oder ca. 13 min.

Zeichnet man $\%B_{OG}$ als horizontale Asymptote zur $\%B_0$ Kurve und $\%B_{OG}/2$ ebenfalls als horizontale Linie in Abb 16a ein und teilt den Ordinatenabschnitt zwischen beiden Linien in 50 gleiche Teile so kann man zu jedem Zeitpunkt die Näherung der Reaktion an den Gleichgewichtszustand in $\%$ ablesen.

Diese Transformation läßt sich analog für alle anderen Dosiswerte von $\%B$ (z.B. $\%B_{25}$, $\%B_{50}$) durchführen. Auf diese Weise kann rationell und exakt die optimale Inkubationszeit für einen RIA bestimmt werden.

Für die Routine empfiehlt sich, die Inkubation am Spätnachmittag zu beginnen und die Reaktion am nächsten Morgen abzustoppen (ca. 17 Std.). So kann man mit einem Gleichgewichts-RIA arbeiten, ohne daß die Inkubationszeit als Zeitverlust anzusehen wäre.

Verschiedene Autoren (JOWETT, 1973; FARMER, 1973) versuchen durch Vorinkubation bei höheren Temperaturen die Gleichgewichtseinstellung zu beschleunigen und dieses dann bei Kühlraumtemperaturen ($+4^\circ\text{C}$) zu stabilisieren. Wir haben versucht, durch 5 min Vorinkubation bei 37°C und anschließend 30 oder 60 min Inkubation bei 4°C einen solchen Effekt zu erzielen. Die Reproduzierbarkeit der Eichkurven im unteren Dosisbereich und die Steilheit waren jedoch schlechter als unter Gleichgewichtsbedingungen.

1.3.6. Reproduzierbarkeit der Eichkurven

In Tab. 12 und Abb. 14 wurden die Ergebnisse von sechs an verschiedenen Tagen unter gleichen experimentellen Bedingungen erstellten Eichkurven einander gegenübergestellt.

Die SD von jeweils drei in einem Assay bestimmten Meßwerten ist bei geringen Aldosterondosen in allen Fällen deutlich kleiner als die Inter-Assay-SD. Die Intra-Assay-SD für $\%B_0$ lag in vier von sechs Fällen zwischen

Tab. 12: Reproduzierbarkeit von Aldosteron-RIA-Eichkurven - Vergleich von sechs an verschiedenen Tagen erstellten Eichkurven

Dosis	5.11.73	23.10.73	22.11.73	15.10.73	17.10.73	5.9.73	MW	± SD	VK						
	%B	±SD	%B	±SD	%B	±SD	%B	±SD	%						
0.0	46.03	1.32	44.14	1.19	50.55	1.37	45.95	1.60	47.99	0.46	49.67	0.45	47.38	2.45	5.17
22.2	38.31	0.73	38.42	0.79	45.41	0.60	43.38	2.35	42.37	0.23	45.64	1.09	42.25	3.25	7.70
44.4	34.24	0.29	34.52	0.38	39.05	0.47	35.08	0.93	36.75	0.57	42.02	0.47	37.13	3.04	8.20
88.8	26.98	0.14	27.34	0.18	31.11	0.47	29.87	0.16	29.22	0.51	34.77	0.33	29.88	2.85	9.55
133.2	24.49	1.26	21.49	0.25	24.63	0.49	23.98	0.48	23.58	0.25	30.54	0.24	24.78	3.03	12.26
177.6	18.41	0.13	19.18	1.34	20.98	0.58	20.02	0.54	19.98	0.13	27.35	1.98	20.98	3.23	15.41
222.0	15.88	0.27	15.88	0.09	17.89	0.47	17.78	0.45	17.72	0.19	23.05	0.73	18.03	2.63	14.59
444.0	9.39	0.15	13.98	0.46	10.29	0.34	9.82	0.03	15.46	0.11	14.05	0.16	12.16	2.62	21.56
532.8	8.58	0.13	9.28	0.08	9.66	0.28	8.64	0.19	10.20	0.14	-	-	9.27	0.68	7.91
621.6	7.61	0.63	7.05	0.28	8.32	0.28	7.23	0.07	10.20	0.17	-	-	8.08	1.28	15.84
B	4.8118		5.0401		5.5857		6.3805		4.8645		5.9103				
A	-1.0001		-1.0148		-1.1341		-1.2655		-0.9725		-1.1168				
R	-0.9967		-0.9900		-0.9984		-0.9919		-0.9892		-0.9992				

Alle Dosispunkte wurden 3-fach bestimmt.

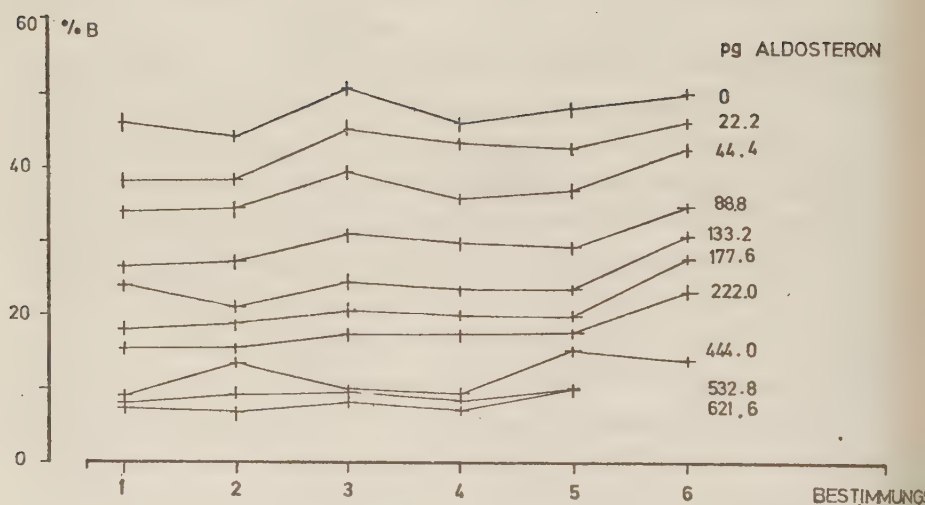


Abb. 17: Inter-Assay-Abweichungen von Eichkurven die an verschiedenen Tagen unter gleichen Bedingungen erstellt wurden. Nachweis der Notwendigkeit, mit jeder Radioimmunoassay-Serie eine eigene Eichkurve anzulegen.

und 1.6%, die Inter-Assay-SD der Tagesbestimmungen vom mittleren $%B_o$ Wert aus allen sechs Eichkurven betrug 2.45% (VK= 5.17% - vgl. rechte Seite in Tab. 12). Bei größerer Aldosterondosis nimmt die Intra-Assay-SD ab. Sie liegt bei 22.2 pg in vier von sechs Fällen unter 1, bei allen höheren Dosispunkten - mit zwei Ausnahmen - sogar deutlich unter 1. Bei Betrachtung von Abb. 14 hat es zunächst den Anschein, als zeige die Inter-Assay-SD eine gleiche Abnahme, denn die Kurvenverläufe glätten sich bei höherer Aldosterondosis. Tatsächlich ist jedoch die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit in den oberen Dosisbereichen geringer als in den unteren. Die SD nimmt eine Ausnahme der beiden höchsten Aldosterondosen trotz der Abnahme der zugrunde liegenden mittleren $%B$ Werte zu, was sich in einem Anstieg der Variationskoeffizienten auf ca 15% widerspiegelt. Der VK liegt in allen Fällen höher als bei $%B_o$. Diese scheinbar gegensätzliche Dosisabhängigkeit der Inter-Assay-Reproduzierbarkeit steht im Widerspruch zu den theoretischen Erwartungen. (RODBARD, 1970) Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der bei großen Aldosterondosen größere Zählfehler sein. Darüberhinaus scheint die Höhe der Inter-Assay-Variationskoeffizienten vornehmlich zu Lasten der Eichkurve vom $%B_o$ zu gehen.

Interessant ist auch ein Vergleich des Profils der Kurven. Bei einer Eichkurve, deren $%B_o$ höher als das einer anderen liegt, sind keineswegs auch immer alle anderen Eichkurvenpunkte erhöht. Dies wird insbesondere an den Eichkurvenpunkten des 1. und 2. sowie des 2. und 3. Tages deutlich. Wiederholte Eichreihen können sich also durch Stauchungen und Dehnungen in verschiedenen Bereichen ein und derselben Eichkurve gegenüber einer Vergleichseichkurve unterscheiden.

Dieser Vergleich beweist die absolute Notwendigkeit, mit jeder Probenserie auch zugleich eine eigene Eichkurve zu erstellen.

4. Blutentnahme und Lagerung von Proben

Die Blutentnahme wird in unserer Klinik folgendermaßen durchgeführt:
bei stationären Patienten: Erste Blutentnahme für Plasmaaldosteron-Analysen

um 8 Uhr morgens vom liegenden Patienten, eine zweite nach 3 Std. Orthostase (Umhergehen in der Ebene).

Bei ambulanten Patienten unter ad lib. Diät: Mindestens ein Ruhewert nach 1 Std. Liegen und eine Orthostasewert.

Die Notwendigkeit der Standardisierung der äußeren Bedingungen insbesondere der Tageszeit, der Diät und die Diuretika- und Laxantienkarenz wurde bereits in Absch. 3. 2. begründet. Aus diesen Gründen sollten Blutentnahmen von ambulanten Patienten für Aldosteronanalysen möglichst vermieden werden.

Die morgendliche Blutentnahme hat mehrere Vorteile: Einmal liegen die physiologischen Morgenwerte des Plasmaaldosterons höher als die Nachmittagswerte (KEM, 1970; MICHELAKIS, 1970; vgl. eigene Ergebnisse Absch. 2. 2.), zum anderen garantiert die Morgensituation Ruhewerte von ausgeruhten Patienten. Labortechnisch ist außerdem der geringere Lipoidgehalt des Plasmas nüchterner Patienten von Vorteil.

Für jede Analyse sollen mindestens 20 ml Blut in ein mit Heparin (1 500 E Liquemin^R) versehenes Gläschen abgenommen werden. Das Blut ist dann sofort zu zentrifugieren und das Plasma anschließend, sofern es nicht sofort verarbeitet werden kann, bei -20°C einzufrieren. Sofortiges Zentrifugieren ist notwendig, um die Bindung größerer Corticosteroidmengen an die Erythrozyten zu verhindern (NEHER, 1963).

Auf Grund unserer Ergebnisse mit eingefrorenen Richtigkeitspoolplasmen kann angenommen werden, daß der Aldosterongehalt in regelrecht eingefrorenem Plasma über mindestens 1 – 2 Jahre konstant bleibt.

1. 5. Extraktion

1. 5. 1. Wahl des Extraktionsmittels

Für die Extraktion von Corticosteroiden steht eine größere Anzahl von organischen Lösungsmitteln zur Auswahl. (HÜBNER & STAIB, 1965) Bei polaren Steroiden empfiehlt sich wegen des günstigen Verteilungskoeffizienten besonders Methylenchlorid oder Äthylacetat. NEHER (1964) empfiehlt unter anderen folgende Verfahren zur Extraktion von Corticosteroiden:

1 Blut mit 1 Vol Wasser verdünnen und 3 mal mit 1.5-3.0 Vol Äthylacetat extrahieren

1 Vol Plasma mit 1 Vol Wasser verdünnen und 3 mal mit 1.5-3.0 Vol Äthylacetat extrahieren.

WATERWOOD(1961) verglich verschiedene Extraktionsmittel und erzielte mit Aldosteron die besten Ergebnisse mit Dichlormethan und Chlorophorm. Methylenechlorid hat gegenüber Chlorophorm den Vorteil größerer Stabilität. Die starke Hepatoxizität ist dagegen grundsätzlich bei Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln zu beachten. Aldosteron zu den Steroiden mittlerer bis hoher Polarität gehört (VEGSEI, 1961) stehen Dichlormethan und Äthylacetat zu Auswahl.

2. Extraktionsverfahren

Extraktion kann man entweder Scheidetrichter oder Magnetrührer verwenden. Nach anfänglichen Versuchen mit Scheidetrichtern und rotierenden Extraktionsvorrichtungen entschieden wir uns für die diskontinuierliche Extraktion in 300 ml Kolben auf Magnetrührern, weil sich damit größere Mengen rationell bearbeiten lassen.

Extraktionszeit sollte bei diesem Verfahren mindestens zwei Stunden betragen.

Bei der Wahl des Extraktionsverfahrens sind auch gewisse physikalische Eigenschaften der Extraktionsmittel mit zu berücksichtigen: Während Äthylacetat sich über der wässrigen Phase sammelt, sinkt Dichlormethan unter die wässrige Phase. Die Verwendung von Äthylacetat ist daher beim Arbeiten mit Scheidetrichtern vorteilhaft, weil man die wässrige Phase unten ablassen kann. Die weiteren Reinigungsschritte - NaOH-Wäsche und Neutralwäsche - kann man mit Scheidetrichtern durchführen. Dagegen empfiehlt sich bei der kontinuierlichen Extraktion auf dem Magnetrührer die Verwendung von Methylenechlorid. Die wässrige Phase kann dann im oberen konisch sich verjüngenden Abschnitt von oben abgesaugt werden.

1.5.3. Lösungsmittelvolumen

Eine Schwierigkeit bei der Extraktion proteinhaltigen Materials wie PI asma ist die Emulsionsbildung, die zu beträchtlicher Reduzierung der Ausbeute Anlaß geben kann. Eine Emulsionsbildung läßt sich durch Verdünnen des Plasmas mit aqua dest. im Verhältnis 1:5 (Vol/Vol) weitgehend verhindern. Bei Extraktion mit Scheidetrichtern kann man Emulsionen durch kräftiges Schütteln zerstören. Bei Extraktion auf dem Magnetrührer ist darauf zu achten, daß die Rotationsgeschwindigkeit nicht zu groß gewählt wird. Das Lösungsmittelvolumen ist ebenfalls kritisch für Ausbeutegrad und Emulsionsbildung.

Auf Grund von Vorversuchen konnten wir mit dem Verhältnis 1:5:25 (Vol. PI asma: Vol. Wasser : Vol. Dichlormethan) bei einmaliger 2-stündiger Extraktion mit dem Magnetrührer zufriedenstellende Resultate erzielen. Falls sich trotz entsprechender Vorsicht einmal eine Emulsion ausgebildet hat, kann man diese durch Unterkühlung oder Zentrifugieren wieder zerstören.

1.5.4. Wiederfindungsanalyse

Alle experimentellen Schritte, angefangen von der Extraktion bis hin zur Elution des Chromatogramms, die der eigentlichen quantitativ ablaufenden Reaktion, dem RIA, vorausgehen, sind mit Verlusten des zu bestimmenden Aldosterons verbunden. Diese Verluste variieren von Experiment zu Experiment und sind deshalb nicht pauschal kalkulierbar. Durch Zusatz von ^3H -Aldosteron als Verlustindikator wird die quantitative Analyse unabhängig vom Grad der Wiederfindung des Aldosterons nach Ablauf aller Reinigungsschritte. Die Notwendigkeit der Begrenzung der Menge des Verlustindikators wurde bereits im theoretischen Teil begründet.

Etwa 1300 cpm ^3H -Aldosteron werden vor der Extraktion dem Plasma zugesetzt. Nach der Zugabe des Verlustindikators sollte einige Zeit bis zum Beginn der Extraktion gewartet werden, damit eine Äquilibration möglich ist. Zugleich werden drei Referenzwerte("100% vor Extraktion") mit je der gleichen Menge Verlustindikator in Packard-Meßgefäße pipettiert

und bis zur Messung der Proben aufbewahrt.

Nach Ablauf aller Reinigungsschritte werden Teilvolumina m (z.B. 500 μl) des Gesamtchromatographieeluates a für die Wiederfindungsanalyse in Packungs-Meßgefäße überführt, zugleich mit den Proben und den "100% v. E." in Lösungssätzen eingedampft und dann mit "Instagel"-Szintillator-Cocktail im Flüssigszintillationszähler gemessen.

Die Wiederfindungsrate ($\text{Rec} = \% \text{ Recovery}$) für jede einzelne Probe berechnet sich dann nach der Gleichung 1:

$$\text{Gleichung 1} \quad \text{Rec} = \% \text{ Wiederfindung} = \frac{W(\text{cpm}) \times 100 \times a}{\text{"100\% v. E."}(\text{cpm}) \times m}$$

bei: a das Gesamtelutionsvolumen in μl
 m das zur Wiederfindungsanalyse eingesetzte Elutionsvolumen in μl
 W die im Volumen m wiedergefundene Radioaktivität in cpm ist.

Versuch: Innerer Standard zugleich als Assay-Tracer

Es lag nahe zu versuchen, die Menge des Inneren Standards (=Verlustindikatoren), die ganz zu Anfang der Analyse der Plasmaprobe zugesetzt wird, groß zu wählen, daß diese Radioaktivität gleichzeitig als Partner der kompetitiven Verdrängungsreaktion Verwendung finden kann. Dadurch würde die Zugabe von radioaktivem Aldosteron zu den Proben vor dem eigentlichen Zählvorgang entfallen und eine individuelle Lokalisation des ^3H -Aldosterons im Chromatogramm auf dem Scanner wäre möglich.

In einem Vorversuch wurde dieses Vorgehen versucht, doch ließen sich keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen. Das $\%B_0$ von Proben mit endogenem Aldosteron lag häufig höher als $\%B_0$ auf der Eichkurve, obwohl gleichzeitig Übereinstimmung von $\%B_0$ in Wasserextrakten mit $\%B_0$ der Eichkurve nachgewiesen war.

Diese überhöhten Probenwerte sind folgendermaßen zu erklären: Es wurde "Unvergleichbares" verglichen. Da die Wiederfindung des Inneren Standards, der zugleich als Tracer im Assay fungiert, von Probe zu Probe variiert und somit nicht vorher berechenbar ist, wurde die Eichkurve zwangsläufig immer mit einer anderen Menge ^3H -Aldosteron erstellt als die Probenassays. Darüberhinaus wird die ^3H -Aldosteron-Aktivität in den Proben abhängig von

dem für den Assay eingesetzten Eluatvolumen.

Die Hauptbedingung für RIAs, nämlich, daß in den Probenansätzen alle Parameter außer der Menge an Testsubstanz mit denen der Eichkurve übereinstimmen sollen, ist somit nicht erfüllt. Diese Modifikation der Methode mit vorzeitiger Tracerzugabe ist also im Aldosteron-Assay im Gegensatz zu Assays mit annähernd gleichmäßiger Ausbeute nicht praktikabel.

1.6. Versuch zur Vereinfachung der Extraktion: Adsorption der Steroide an XAD-2o-Ionenaustauschharze

Extraktion und Eindampfen der großen Lösungsmittelvolumina sind zeitaufwendige Prozeduren. Wir haben daher versucht, die Extraktion mit Lösungsmitteln zu umgehen und statt dessen die Steroide durch Adsorption an XAD-2o-Ionenaustauschharz von den übrigen Plasmabestandteilen zu trennen.

Säulen wurden mit XAD-2o über eine Glaswollschicht beschickt, dann 2o min mit 1o ml aqua dest. quellen gelassen. Auf die so präparierten Säulen wurde je 5 ml in 3o ml Wasser verdünntes Plasma zusammen mit 446 cpm ³H-Aldosteron als Verlustindikator aufgegeben. Das durchlaufende wässrige Eluat wurde verworfen, ebenso das Eluat zweimaligen Nachspülens mit je 5 ml aqua dest. Dann wurde versucht, die Steroide durch Elution mit Methanol (15 ml) wieder von dem Harz zu lösen. Leider war die Wiederfindungsrate so schlecht (o - 2o%), daß wir diesen Weg wieder aufgeben mußten. Es erscheint jedoch nicht aussichtslos analog zu diesem Experiment verschiedene Harze und verschiedene Elutionsmittel systematisch auf ihre Fähigkeit, Steroide direkt aus Plasma zu trennen, zu untersuchen.

1.7. Abtrennung von Phenolkörpern und Lipiden

Der Dichlormethan-Plasmaextrakt enthält noch beträchtliche Mengen an Lipiden und phenolischen Steroiden (Östrogene).

Die Phenolkörper lassen sich durch Waschen mit o.1 Vol(1 Vol =Gesamtextrakt) NaOH entfernen. Während man bei vielen Corticosteroiden durchaus mit 1-2.5 n NaOH arbeiten kann, empfiehlt sich bei den alkalilabilen Corticosteroiden, zu denen auch Aldosteron gehört, nur o.1 n NaOH zu verwenden.

HÜBNER&STAIB, 1965)

Nach dem Absaugen der wässrigen Phase geben wir 25 ml 0.1 n NaOH zu dem Dichlormethan-Extrakt und rühren nochmals ca 10 min. Die NaOH wird mit einer Pasteur-Pipette über eine Wasserstrahlpumpe wieder abgesaugt und anschließend noch 1 bis 2 mal mit ebenfalls 0.1 Vol aqua dest. neutral gewaschen. Auch diese wässrige Phase wird wieder mit der Pasteur-Pipette abgesaugt.

Um unnötige Verluste zu vermeiden, empfiehlt es sich, die NaOH und Wasservolumina möglichst gering zu halten und beim Absaugen sehr sorgfältig vorzugehen. Nach der Alkaliwäsche konnten wir zwischen 75 und 90% des ^3H -Aldosterons wiederfinden.

Durch die Alkaliwäsche wird außer den Phenolkörpern auch ein Teil der freien Fettsäuren entfernt.

Die Lipide lassen sich aber auch durch Ausfrieren in 70%-igem Methanol oder durch Lösungsmittelverteilung zwischen Methanol und Hexan, Heptan oder Petroläther abtrennen, wobei sich die Steroide in der Methanolphase, die Lipide in der Hexan-Heptan- oder Petrolätherphase anreichern (HÜBNER & STAIB, 1965).

Die Notwendigkeit einer solchen Flüssigkeitsverteilung ergab sich im Laufe unserer Vorversuche mit Äthylacetatextraktion. Es zeigte sich, daß Äthylacetatextrakte relativ große Lipidmengen enthielten, die in der Dünnschicht- und auch Papierchromatographie zu erheblichen Ungenauigkeiten (Verschmierungen) Anlaß gaben.

Wir haben daher versucht diese Lipide durch eine Heptan-Methanol-Flüssigkeitsverteilung vor der Chromatographie zu beseitigen. Bei der Verwendung von Dichlormethan als Extraktionsmittel erübrigte sich eine Flüssigkeitsverteilung, weil Dichlormethan anscheinend weniger Lipide extrahiert.

8. Entwässern und Einengen der Extrakte

Um verbleibende Wasserreste aus dem Extrakt zu entfernen, wird nach der Neutralwäsche über Na_2SO_4 filtriert. Dabei ist darauf zu achten, daß das

Na_2SO_4 vorher gut mit Dichlormethan angefeuchtet und nach dem Filtrieren des Extraktes gut nachgespült wird. Das Filtrat wird in etwa 250 ml fassenden Herzkolben aufgefangen, in denen dann auch das Einengen auf dem Rotationsverdampfer erfolgen kann.

1.9. Chromatographie

Die Notwendigkeit einer chromatographischen Isolierung des Aldosterons aus dem Plasmaextrakt ist aus zwei Gründen gegeben:

1. In dem Plasmaextrakt sind außer dem Aldosteron noch zahlreiche andere Steroide in großen Mengen enthalten.
2. Die Spezifität der Immunreaktion ist nicht so eng begrenzt, daß Kreuzreaktionen mit großen Mengen anderer Corticosteroide, insbesondere Cortison und Cortisol vernachlässigt werden könnten.

Den experimentellen Beweis für diese beiden Behauptungen erbringt die im Abschnitt 2.1.2.2. bei den Spezifitätsnachweisen wiedergegebene Chromatogrammanalyse.

Die Chromatographie erwies sich als ein besonders kritischer Punkt in der gesamten Entwicklung der RIA-Methodik. Wiederholt waren wir gezwungen methodische Konzepte zu verwerfen, weil Blank-Phänomene, die offensichtlich durch die Chromatographie bedingt waren, nicht beseitigt werden konnten. Unser erstes Konzept war, Aldosteron durch eine Papierchromatographie von den übrigen Steroiden zu isolieren und den im Papiereluat zu erwartenden Blank durch eine Dünnschicht-Rechromatographie zu eliminieren.

1.9.1. Papierchromatographie(PC)

Die Papierchromatographie ist eine bewährte Methode zur Trennung von Corticosteroiden. (BUSH, 1952; ZAFFARONI, 1950; NEHER, 1964)

Die dabei verwendeten Lösungsmittelsysteme werden entweder nach der Art der Aufbringung der stationären Phase, durch Imprägnieren (Zaffaroni-Typ) oder durch Äquilbrieren (Bush-Typ), oder nach der Polarität der bevorzugt getrennten Substanzen (VECSEI, 1971) eingeteilt.

bei der Auswahl des PC-Systems ließen wir uns von zwei Überlegungen

- Leiten: 1. Das System sollte Aldosteron möglichst sicher von anderen Steroiden, insbesondere Cortisol und Cortison, isolieren.
2. Das System sollte sich mit einem sicheren Lokalisationsverfahren kombinieren lassen.

Ein System, das die erste Forderung in hervorragender Weise erfüllt ist

das von VECSEI (pers. Mitteilung) entwickelte Isoamylacetat-Methanol-System

mit $M(70\%) = 1:4$ (Vol/Vol).

Das Chromatographiepapier wird nach dem Auftragen des zu trennenden

Substanzgemisches zunächst wie ein Zaffaroni-System mit Isoamylacetat/

Methanol (70%) 1:4 imprägniert und nach 10 min Lufttrocknung mit der mobilen

Phase – wassergesättigtes Isoamylacetat – gestartet und absteigend ent-

wickelt. Die Atmosphäre des Chromatographietanks ist mit beiden Phasen

zu sättigen.

Bei einer Testchromatographie mit reinen Steroiden auf Whatman 1 Papier

(16 Std. im Durchlauf) und anschließender Lokalisation der Testsubstanzen

mit der Tetrazolium-Blau-Reaktion konnten wir die exzellente Isolierung

des Aldosterons in diesem System nachweisen. Im Einzelnen ergaben sich

folgende R-Werte bezogen auf den Farbstoff Isatin:

Tab. 13 : Chromatographisches Verhalten von Corticosteroiden in einem PC-System (Isoamylacetat/Methanol(70%) – 1:4)

Papier: Whatman 1

Imprägnierung: mit der stationären Phase

Entwicklung: 16 Std. absteigend im Durchlauf bei 20° C

	Aldo	THE	THF	E	A	F	B	THB	THS	THA	DOC	TH-DOC
--	------	-----	-----	---	---	---	---	-----	-----	-----	-----	--------

R _f Isat.	0.44	0.81	0.90	0.92	0.96	0.98	0.98	0.98	0.98	1.0	durchgelaufen	
----------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-----	---------------	--

Referenzsubstanz: Isatin 1.0 – 44 cm

Alle für Kreuzreaktionen in Frage kommenden Steroide haben eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als Aldosteron.

Das System ist zur Weiterverarbeitung von Dichlormethan-Plasmaextrakten

gut geeignet. Schwierigkeiten hatten wir mit Äthylacetat-Extrakten, die trotz

Alkaliwäsche noch größere Mengen von Lipoiden enthielten, welche zu Verschmierungen im Chromatogramm führten. Wir haben dieses Problem, um eine Flüssigkeitsverteilung zu umgehen, kurzfristig durch Verwendung stärkeren Chromatographiepapiers (MN 212) zu überwinden versucht, doch ohne wesentlichen Erfolg. Das Trennverhalten des Lösungsmittelsystems ist auf MN 212 Papier ähnlich demjenigen auf Wh 1 Papier.

Schwierigkeiten bereitete die zuverlässige Lokalisierung des Aldosterons auf Isoamylacetat-Methanol-Chromatogrammen. Das ideale Lokalisationsverfahren ist die Auffindung der tatsächlichen individuellen Chromatogrammzone des Aldosterons auf jedem einzelnen Chromatogramstreifen. Wir haben deshalb versucht, die Lokalisation des Aldosterons auf Grund der Radioaktivität des zugesetzten Verlustindikators auf dem Radiochromatographen (Scanner) durchzuführen, doch die Empfindlichkeit unseres Gerätes (Packard 7201) reicht auch bei größter Verstärkung nicht aus, um die geringe Radioaktivität von weniger als 1 300 cpm zu lokalisieren. Der naheliegende Ausweg, die Menge des Verlustindikators zu erhöhen, kommt wie bereits im Absch. 1.5.4. diskutiert nicht in Frage.

Auch das Anlegen von Pilotstreifen mit großen Mengen reinen Aldosterons und nachfolgender Lokalisierung durch die Blau-Tetrazolium-Reaktion - Sichtbarmachen der Aldosteronzone durch Überführung des Aldosterons in das blau gefärbte Tetrazoliumsalz - verbietet sich wegen der Gefahr der Aldosteron-Sublimation von den Pilotstreifen auf die Teststreifen.

Als Lösungsweg bieten sich daher Pilotstreifen mit ^3H -Aldosteron an: Die Aldosteronmenge, die notwendig ist, um eine nachfolgende Lokalisierung auf dem Scanner zu ermöglichen, ist wesentlich geringer als die Menge, welche für den chemischen Nachweis mit der BT-Methode benötigt wird. Die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse durch Sublimation wird dadurch gering gehalten.

Dieses Verfahren allein hat jedoch den Nachteil, daß individuelle Laufdifferenzen einzelner Streifen kaum zu berücksichtigen sind. Dadurch ist diese Lokalisationstechnik mit einem beträchtlichen Unsicherheitsfaktor belastet, was sich in vielen Fällen als schlechte Aldosteronausbeute im Eluat bemerkbar macht.

inen wesentlichen Vorteil gegenüber dem zuvor beschriebenen Isoamyl-petatl-Methanol-System bietet im Hinblick auf die Lokalisation des Aldosterons eine ebenfalls von VECSEI(pers. Mitteilung) entwickelte Modifikation des Bush-B-5 Systems.

Im Original B-5 System (Benzol-Methanol-Wasser 100:55:45 (Vol/Vol/Vol)) (BUSH, 1952) läuft der Farbstoff Isatin zwischen Cortisol und Aldosteron. Aldosteron ($R_{\text{Isatin}} = 1.047$) läuft vor Cortisol ($R_{\text{Isatin}} = 0.661$) und kurz nach Cortisol ($R_{\text{Isatin}} = 1.323$). Durch Zusatz von Isooctan gelang es Vecsei die Wanderungsgeschwindigkeit der Steroide so zu verändern, daß Isatin bei einer Laufzeit von etwa 7 Std. nur knapp vor Aldosteron ($R_{\text{Isatin}} = 0.84-0.86$) läuft, der Farbstoff somit sehr gut zur individuellen Lokalisierung der Aldosteronlaufstrecke auf jedem Probenstreifen herangezogen werden kann. In diesem IB/MW-System (Isooctan-Benzol-Methanol-Wasser 20/80/55/45 (Vol)) läuft Cortisol nach dem Aldosteron, Cortisol vor dem Isatin und Aldosteron. Im Gegensatz zum Bush-B 5 System, wo Cortisol dichter als Aldosteron läuft, bleibt im IB/MW-System Cortisol etwas näher beim Aldosteron. Die Isolierung von Cortisol ist im Übrigen auf Grund des zwischen diesem und dem Aldosteron laufenden Isatin unproblematisch.

Tab. 14 : Chromatographisches Verhalten von Aldosteron und anderen Corticosteroiden im modifizierten Bush-B-5 System nach VECSEI

System: Isooctan-Benzol-Methanol-Wasser 20/80/55/45 (Vol)

Papier: Whatman 1

Äquilibrierung: 14 Std.

Entwicklung: 7 Std. 30 min absteigend bei 20°C

	THF	THE	F	Aldo	Isatin	E
R_{Isatin}	0.24	0.53	0.48- 0.54	0.76- 0.86	1.0	1.06- 1.23

Die Trennung des Aldosterons, insbesondere von Cortisol, ist exakter als nach Imprägnierung, wenn man wie bei allen Chromatogrammen des Bush-Typs vor der eigentlichen Entwicklung etwa 12 Std. in gesättigter Tankatmosphäre äquilibriert, um die stationäre Phase (Methanol/Wasser) dampfförmig

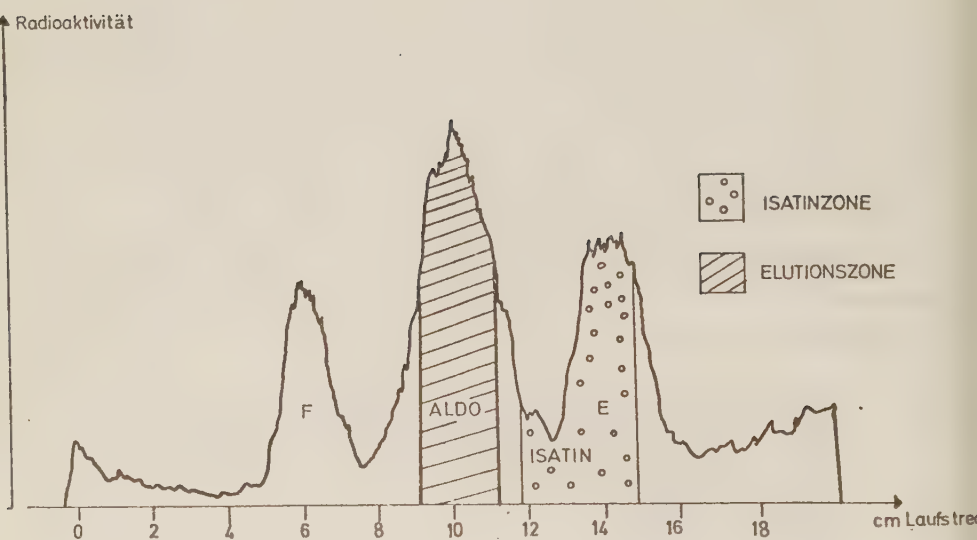


Abb. 18: Radiochromatogramm nach einem Papierchromatogramm, das 7 Std. 30 min. im IB/MW-System(nach VECSEI modifiziertes BUSH B 5 System) entwickelt wurde.

uf das Papier zu bringen.

ie einwandfreie Trennung von Aldosteron, Cortisol und Cortison wird durch das abgebildete Radiochromatogramm belegt. (Abb. 18) Das zugehörige Chromatogramm wurde im IB/MW-System auf Wh 1 Papier nach vorheriger 14 stündiger Äquilibration 7 Std. 30 min. entwickelt.

Die Möglichkeit der sicheren Lokalisierung des Aldosterons war schließlich ausschlaggebend für die Entscheidung zu Gunsten des modifizierten B-5 Systems.

Um ein Maximum an Sicherheit bei der Auffindung der Aldosteronzone zu erreichen führen wir die Lokalisation auf folgende Weise durch:

• Pro Chromatographiepapier werden mindestens 3 Pilotstreifen – je einer auf beiden Seiten und einer in der Mitte – mit radioaktivem ^3H -Aldosteron zur Lokalisation der Aldosteronzone, ^3H -F und ^3H -E zur Kontrolle der einwandfreien Trennung von diesen Steroiden mitentwickelt und anschließend auf dem Scanner lokalisiert. Aus den Laufstrecken des "Pilot-Aldosterons" und des Isatins werden die R_{Isatin} -Werte für Aldosteron berechnet:

$$\text{Gl. 4} \quad R_{\text{Isatin}} = \frac{\text{Laufstrecke Aldosteron (cm)}}{\text{Laufstrecke Isatin (cm)}}$$

2. Mit jeder Probe wird ebenfalls 20 µl gesättigte Isatin-Lösung aufgetragen. Nach der Entwicklung wird die mittlere Isatinlaufstrecke auf jedem Probenstreifen markiert und vom Start gemessen.

3. Die Berechnung der Aldosteronlaufstrecke erfolgt für jeden Probenstreifen einzeln nach der Gleichung:

$$\text{Gl. 5} \quad \text{Laufstrecke Aldosteron} = \text{Laufstrecke Isatin} \times R_{\text{Isatin}}$$

wobei für R_{Isatin} das arithmetische Mittel aus mehreren ermittelten Werten von verschiedenen Pilotstreifen eingesetzt wird.

4. Auf jedem Probenstreifen wird der Bereich von 1 cm vor bis 1 cm nach der Linie, bis zu der die Aldosteron-Laufstrecke berechnet wurde ausgeschnitten und eluiert.

Die Qualität der Trennung von E, F und Aldosteron läßt sich für jedes Chromatogramm an Hand der Radiochromatogramme beurteilen.

1.9.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der DC wurden insbesondere von STAHL(1962) erprobt und standardisiert. (STAHL, 1968) LOMMER entwickelte 1962 verschiedene DC-Systeme zur Trennung von Corticosteroiden.

In radioimmunologischen Methoden hat die DC bisher nur wenig Anwendung gefunden. Diese Tatsache ist auf einen Umstand zurückzuführen, der inzwischen von mehreren mit RIAs befassten Forschergruppen berichtet wurde, nämlich daß die DC schwer eliminierbare Blanks hervorruft (CREPY, 1969; ST. CYR, 1972). Zum Zeitpunkt des Beginns unserer Untersuchungen für diesen Aldosteron-RIA lagen jedoch noch wenige Untersuchungen hierüber vor.

Wir hatten, wie eingangs dieses Kapitels erwähnt, die DC sogar primär als Mittel zur Blank-Eliminierung im Anschluß an die Papierchromatographische Isolierung des Aldosterons konzipiert. Aus diesem Grund konnten wir auf die Erprobung der Trennungseigenschaften verschiedener Systeme weitgehend verzichten, und uns damit begnügen, ein einfaches System für Aldosteron zu finden. Zu diesem Zweck charakterisierten wir das chromatographische Verhalten von Aldosteron in unterschiedlichen Mischungen von Methanol und Chloroform.

Tab. 15 : Mischungsreihe von Chloroform und Methanol zur Auswahl eines DC-Systems für Aldosteron

aufsteigende Entwicklung; Laufzeit: 80 min ; Temp. ca. 20° C

CHCl ₃ ml	CH ₃ OH ml	Mischungsverhältnis Vol/Vol	R _F Aldosteron -
100	-	1: 0	0
90	9	10: 1	0.36
80	16	10: 2	0.58
80	24	10: 3	0.66
70	28	10: 4	0.66
60	30	10: 5	0.69

Das System Chloroform/Methanol - 10:1 (Vol/Vol) erschien für unsere Zwecke geeignet.

Die Lokalisierung größerer Mengen von 4-en-3-keto-Steroiden auf DC-Platten bereitet keine Schwierigkeiten. Diese Substanzen haben ein Absorptionsmaximum für kurzwelliges UV-Licht bei 245 nm und können daher leicht durch ihren fluoreszenzlöschenden Effekt auf Kieselgelplatten mit fluoreszierenden Zusätzen (z. B. Polygram Sil-G-UV) im UV-Licht nachgewiesen werden. Darüberhinaus besteht bei großen Substanzmengen natürlich wie bei der PC die Möglichkeit des Nachweises durch spezifische Farbreaktionen. Bei so geringen Aldosteronmengen, wie sie bei einer Plasmaaldosteron-Analyse zur Verarbeitung kommen, scheiden diese beiden Lokalisationstechniken von vornherein aus. Wir versuchten daher einen Farbstoff zu finden, der in dem ausgewählten CH/M-System, analog dem Isatin im IB/MW-PC-System, ähnliches oder identisches chromatographisches Verhalten zeigt wie Aldosteron.

In einer Versuchsserie mit Isatin, Rhodamin, Sudan III und Neutralrot konnten wir eine derartige Übereinstimmung zwischen Aldosteron und Neutralrot nachweisen. Tab. 16 faßt das Ergebnis dieses Versuches zusammen.

Tab. 16 : Vergleich des chromatographischen Verhaltens verschiedener Farbstoffe in einem DC-System

System: Chloroform-Methanol 10/1 (Vol/Vol)
 Laufzeit: 80 min ; aufsteigende Entwicklung; 20°C

	Aldo	B	DOC	Prog	Rhodamin	Sudan III	Isatin
Laufstrecke (cm)	6.1	7.2	12.4	13.1	0.0	14.0	8.0
R _{Neutralrot}	1.0	1.18	2.04	2.15	-	-	-

Als geeignete Menge erwies sich 5 µl einer 0.005% igen Neutralrotlösung. Vor der Anwendung des Neutralrots als Hilfsstoff zur Lokalisierung bedurfte es noch eines Nachweises, daß der Farbstoff die Immunreaktion nicht unspezifisch beeinflußt. Um dies zu überprüfen wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Mehrere Kieselgelplatten (Polygram Sil-G-UV), die zuvor durch eine einmalige Leerentwicklung mit Äthanol gewaschen waren, wurden durch Auskratzen des Kieselgels in mehrere Bahnen von 3.0 cm Breite unterteilt.

5 Bahnen wurden am Start mit je 5 μ l Isatin beschickt, 6 Bahnen wurden ohne jeden Substanzauftrag als Leerwerte belassen. Nach 80 min aufsteigender Entwicklung im CH/M-System wurden die Neutralrotbereiche und die korrespondierenden Bereiche auf den Leerstreifen ausgeschnitten und in je 4 ml Äthanol 20 min unter Schütteln eluiert. Um die suspendierten Kieselgelpartikel abzutrennen wurde das Eluat dann über Fritten gesaugt, 3 mal mit je 0.5 ml Äthanol nachgespült und schließlich eingedampft. Der Abdampfrückstand wurde mit 1.3 ml Äthanol wieder aufgenommen und nach Äquilibration von jeder Probe 2 mal 0.5 ml Eluat in Assay-Gefäße überführt. Die Eluate wurden dann zusammen mit dem Tracer für den RIA eingeeengt und der RIA in der zuvor beschriebenen Weise durchgeführt. Zur Blankkontrolle wurden gleichzeitig 5 Eichansätze ohne Aldosteronzusatz (und natürlich ohne Eluat) zur Bestimmung des $\%B_0$ -Wertes mitbearbeitet. Das Resultat dieses Experimentes ist in der Tab. 17 wiedergegeben. Die Ergebnisse der Leerwerte und der Teststreifen mit Neutralrot weichen nicht signifikant ($p > 0.1$) voneinander ab. Dagegen ist die 3H -Aldosteron-Bindung ($\%B$) bei allen RIAs mit DC-Eluat-Zusatz signifikant ($p < 0.02$) höher als bei Abwesenheit von Aldosteron in den Proben zu erwarten wäre, das heißt höher als $\%B_0$ in den Kontrollansätzen ohne Aldosteronzusatz. Die Ausgangsfrage, ob Neutralrot selbst den Assay beeinflusst ist also zu verneinen, dagegen ist festzustellen, daß das DC-Eluat selbst einen beträchtlichen unspezifischen Anstieg der 3H -Aldosteron-Bindung verursacht, oder kurz gesagt: Das DC-Eluat verursacht einen negativen¹ Blank. ($\%B_{\text{Leerwert DC}} > \%B_{\text{Eichkurve}}$). Durch dieses Ergebnis war natürlich sehr in Frage gestellt, ob es überhaupt möglich sein würde eine DC für die ihr in der ursprünglichen Konzeption zugeordnete Funktion, Beseitigung eines Blanks, einzusetzen, und ob nicht im Gegenteil der Blank durch die DC auf Kieselgel nur vergrößert wird.

1) "Negativ", weil durch das überhöhte $\%B$ eine "negative Aldosteronmenge" vorgetäuscht wird. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß Kieselgelpartikel AG ähnlich wie AK an sich binden.

Tab. 17 : Versuch zum Ausschluß unspezifischer Effekte durch Neutralrot und zur Kontrolle auf unspezifischen BI anks in DC-Leerwert-eluat

DC-Platte: Polygram Sil-G-UV einmal in Äthanol gewaschen

Elution: in 4 ml Äthanol, 20 min geschüttelt

Zusatzmaßnahmen: Fritten

Probe	cpm		%B		MW $\pm$ SD
	Doppelassay		Doppelassay		
Kontrollwerte (K)	4158	4285	56.0	57.7	56.54 $\pm$ 1.2
0 pg	4122	4124	55.5	55.5	
"Eichkurve"	4336		58.0		
DC-Eluate von Leerwerten	3820	3354	66.9	58.7	61.60 $\pm$ 2.85
	3475	3421	60.0	59.9	
	3544	3488	62.0	61.1	
	3640	3598	63.7	63.0	
	3683	3632	64.5	63.6	
	3263	3344	57.2	58.6	
DC-Eluate von Streifen mit 5 ul Neutralrot	3774	3478	66.0	60.1	64.61 $\pm$ 4.4
	3613	3592	63.3	62.9	
	3497	3300	61.3	57.8	
	4047	3972	70.9	69.6	
	3681	3979	64.5	69.7	

100 % ^3H -Aldosteron: MW 14 843 cpm

Vergleich der drei Kollektive im ungepaarten T-Test:

$\%B_{OK} / \%B_{0 \text{ DC-Leer}}$: T = 3.7726 $p < 0.02$ signifikanter Unterschied

$\%B_{0 \text{ DC-Leer}} / \%B_{0 \text{ DC} + \text{Neutr. rot}}$: T = 1.9344 $p > 0.1$ nicht signifikanter Unterschied

1.10. Versuche zur Blank-Eliminierung

Mit der Beobachtung der unspezifischen BI anks stellte sich die Frage nach der oder den Ursachen dieses Phänomens und den möglichen Wirkungsmechanismen der Beeinflussung der Immunreaktion. In der Beantwortung zumindest der ersten Frage liegt naturgemäß die Problemlösung. Da eine endgültige Antwort auf die Frage nach den Blankursachen aber bis heute noch nicht möglich ist, stützen wir uns bei der Konzeption von Maßnahmen zur Blank-Beseitigung auf folgende Hypothese:

Das Blank-Phänomen wird durch bisher unbekannte Stoffe verursacht, die bei der Elution des Chromatographiematerials (Papier, Kieselgel etc.) mit herausgelöst werden und so in das Eluat gelangen. Diese Substanzen verursachen im RIA eine unspezifische – d. h. nicht Aldosteron bedingte – Beeinflussung der Immunreaktion. Über den oder die Angriffspunkte der Substanzen können bisher nur Spekulationen angestellt werden. (vgl. I, 6. 11.)

Ausgehend von dieser Hypothese sahen wir zwei grundsätzliche Ansatzpunkte zur Blank-Eliminierung und die nachfolgend genannten experimentellen Möglichkeiten zu ihrer Verwirklichung:

A) primäre Vermeidung der Elution Blank verursachender Stoffe (BvS)

- a – durch Auswahl eines geeigneten Trägermaterials für die Chromatographie
- b – durch vorheriges Waschen des Trägermaterials mit verschiedenen Lösungsmitteln, um evtl. vorhandene BvS bereits vor der Verwendung im Chromatographiesystem zu eluieren.
- c – durch Fixierung der BvS durch Hitzeaktivierung der Dünnschichtplatten.
- d – durch vorsichtige Elution ohne Schütteln
- e – durch Auswahl eines Elutionsmittels, das zwar Aldosteron, nicht aber die BvS eluiert
- f – durch Verwendung kleiner Lösungsmittelvolumina zur Elution

B) sekundäre Eliminierung von bereits im Eluat gelösten BvS

- a – durch nachfolgende Reinigung des DC oder PC Eluats mittels Filtration, Rechromatographie oder ähnlichen Verfahren

1.10.1. Prüfverfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Blank-Phänomens

Die Prüfung verschiedener experimenteller Modifikationen auf Blank-Freiheit erfolgte analog dem im Abschnitt 1.9.2. zuletzt beschriebenen Experiment nach folgendem Verfahren:

Erstellung einer Eichkurve unter standardisierten Bedingungen. Am wichtigsten ist die Bestimmung von $\%B_0$.

Analyse von Leerwerten: Die zu prüfende experimentelle Modifikation der Chromatographie wird ohne Substanzauftrag nur mit H_2O an Stelle von Plasmaextrakt durchgeführt. Das vermeintliche "Leereluat" – leer im Hinblick auf den Aldosterongehalt – wird durch Zusatz einer mit der in den Eichkurvenansätzen enthaltenen Menge identischen 3H -Aldosteron- und Antiserum-Menge zusammen mit der Eichkurve analysiert.

Analyse bekannter Aldosteronmengen: An Stelle von Plasmaextrakt wird eine definierte Menge inaktiven Aldosterons (100, 220 pg) analysiert. In diesem Fall ist der Probe zu Beginn auch ca. 1500 cpm 3H -Aldosteron Verlustindikator zur Wiederfindungsanalyse zuzusetzen.

Diese wird in der zuvor beschriebenen Weise in einem Teilvolumen des Eluates ausgeführt. Aus der Gesamtwiederfindung Rec. (Gl. 1) errechnet sich die "erwartete Aldosteronmenge in der Probe" ($Aldo_{erw./Probe}$) nach Gl. 6:

$$6 \quad Aldo_{erw./Probe} (pg) = \frac{Aldo_{Zusatz} (pg) \times Rec. \times m}{100 \times a}$$

Rec. = Gesamtwiederfindung in %

a = Gesamtelutionsvolumen in μl

m = zur Wiederfindungsanalyse eingesetztes Elutionsvolumen in μl

Zwei weitere Teilvolumina des Eluates werden unter den gleichen Bedingungen wie die Eichkurve analysiert (identische 3H -Aldosteron-Konzentration, identische Antiserum-Arbeitslösung, gleichzeitige Inkubation). Die Kalkulation des Blanks erfolgt nach Gl. 7 durch Bildung der Differenz aus der tatsächlich gemessenen Aldosteronmenge und der im Ansatz erwarteten Aldosteronmenge.

$$7 \quad Blank(BI) (pg) = Aldo_{Ist}/Probe - Aldo_{erw./Probe}$$

Ist $\%B$ bei einer Probe größer als $\%B_0$ der Eichkurve, so ist der Blank bei der Dosis negativ.

1. 10. 2. Blank-reduzierende Wirkung verschiedener experimenteller Modifikationen papier- und dünnschichtchromatographischer Systeme

1. 10. 2. 1. Papierchromatographische Systeme

A) Papier: MN 212 ohne Vorbehandlung

System: Isoamylacetat/Methanol(70%) 1:4 (Vol/Vol)

Entwicklung: 17 Std. absteigend

Elution: 1 mal mit 5 ml Äthanol 20 min. unter Schütteln

2 mal mit 5 ml Äthanol nacheluiert

Weitere Behandlung: Einengen auf dem Rotationsverdampfer bei 37°C
Aufnehmen in 1 ml Äthanol, 0.2 ml für Wiederfindungsanalyse, 0.7 ml für Assay

Probe	Aldo- zusatz (pg)	R (%)	Aldo erw/Pr. (pg)	1) %B erw	2) %B Ist	Aldo Ist/Pr. (pg)	3) Blank ³⁾ (pg)
oo1	0.0	43.4	0.0	50.15	8.25		+++
oo2	0.0	34.5	0.0	50.15	4.85		+++

B) wie A nur:

Elution: mit 5 ml aqua bidest. 20 min unter Schütteln

2 mal mit je 5 ml aqua bidest. nacheluiert

Weitere Behandlung: Einengen auf dem Rotationsverdampfer bei 37°C
Aufnehmen in Äthanol

oo3	0.0	40.6	0.0	50.15	10.9		++
-----	-----	------	-----	-------	------	--	----

C) Papier: Wh 1 ohne Vorbehandlung

System: Isooctan-Benzol-Methanol-Wasser 20:80:55:45 (Vol)

Entwicklung: 5 Std. absteigend

Elution: mit 1 ml aqua bidest. 20 min unter Schütteln

mit 2 mal 1 ml aqua bidest. nacheluiert

Weitere Behandlung: Einengen auf dem Rotationsverdampfer, Aufnehmen
in Äthanol, weiter wie A

oo7	0.0	-	0.0	60.0	40.69	91.4	91.4
oo8	0.0	-	0.0	60.0	37.23	111.5	111.5
o10	0.0	-	0.0	60.0	33.8	133.3	133.3

1) Dieser Wert wurde nach Gl. 6 berechnet.

2) Dieser Wert wurde aus der jeweiligen Eichkurve durch Aufsuchen des zur erwarteten Aldosteronmenge zugehörigen %B-Wertes ermittelt.

3) In den Experimenten A und B wurde der Blank nur durch die Symbole +, ++ und +++ halbquantitativ abgeschätzt, da in diesen Fällen nur %B₀ und nicht vollständige Eichkureven ermittelt wurden. Aus dem gleichen Grunde konnten hier auch die Aldosteron-Ist-Werte nicht kalkuliert werden.

D) wie C nur:

Entwicklung: 12 Std. 30 min absteigend

Elution: mit 1,2 ml aqua bidest. 3 Std. ohne Schütteln

Weitere Behandlung: Über Glaswolle-Säule (gestopfte Pasteur-Mikropipette) filtriert, dann Eluat direkt in Assay

Probe	Aldo- zusatz (pg)	R (%)	Aldo erw/Pr. (pg)	%B erw	%B Ist	Aldo Ist/Pr. (pg)	Blank (pg)
o11	o.o	-	o.o	65.57	61.2	12.5	12.5
o12	o.o	-	o.o	65.57	61.04	13.0	13.0
o13	o.o	-	o.o	65.57	65.51	o.o	o.o
o14	o.o	-	o.o	65.57	69.26	o.o	o.o
o15	o.o	-	o.o	65.57	65.31	o.o	o.o
o16	o.o	-	o.o	65.57	62.85	6.0	6.0

E) wie D nur:

Behandlung nach der Elution: keine Glaswollensäule; Teilvolumina des Eluats direkt aus dem Elutionsgefäß in Assaygefäße pipettiert.

N-11a	o.o	-	o.o	56	56	o.o	o.o
N-11b	o.o	-	o.o	56	56	o.o	o.o
N-12a	o.o	-	o.o	56	56	o.o	o.o
N-12b	o.o	-	o.o	56	56	o.o	o.o
R-P-31	o.o	-	o.o	50	49	8.2	8.2
R-P-32	o.o	-	o.o	50	51	o.o	negativ

1.10.2.2. Dünnschichtchromatographische Systeme

F) Sorbent: Kieselgel auf Plastik (Polygram Sil. G. UV) unbehandelt

System: Chloroform/Methanol 10:1 (Vol/Vol)

Entwicklung: 60 min eindimensional aufsteigend

Elution: 20 min stehend in 5 ml Äthanol

Weitere Behandlung: Eluat über Fritten mit 2 cm Äthanol-gewaschener Celite-Säule filtriert, Nachelution mit 2 mal 5 ml Äthanol. Einengen des Eluates und wieder in 1 ml Äthanol aufnehmen, Teilvolumina für den RIA

B-17	o.o	78.9	o.o	57.29	34.34	166.6	166.6
B-18	o.o	75.2	o.o	57.29	38.20	136.6	136.6
B-19	o.o	72.3	o.o	57.29	40.67	119.4	119.4
B-20	220.o	79.3	122.1	38	27.23	234.4	112.3
B-21	220.o	77.7	119.7	38.5	18.58	361.1	241.4

G) wie F nur:

Sorbent: DC-Platte zuvor in drei Systemen gewaschen: 1. Dichlormethan
2. Äthylacetat-Chloroform-Methanol 1:1:1 3. Chloroform-Aceton 8.5:1.5

Elution: mit 5 ml Äthanol + 2 mal mit je 5 ml Äthanol nacheeluiert

Probe	Aldo zusatz (pg)	R (%)	Aldo erw./Pr. (pg)	%B erw	%B Ist	Aldo Ist/Pr. (pg)	Blank (pg)
B-32	0.0	69	0.0	60.0	40.9	89.9	89.9
B-33	0.0	57	0.0	60.0	41.3	87.7	87.7

H) wie F nur:

Elution: 20 min stehend in 5 ml aqua bidest.

Weitere Behandlung: Eluat über Fritten ohne Celite - Säule gesaugt, dann eingeeengt und in 1 ml Äthanol wieder aufgenommen.

B-22	0.0	49.2	0.0	57.3	44.97	90	90
B-23	0.0	57.0	0.0	57.3	42.54	106	106
B-24	0.0	47.5	0.0	57.3	47.32	75	75
B-25	220.0	51.4	79.2	44.5	37.91	138	59
B-26	220.0	50.9	78.4	44.5	31.21	194	165.6

I) wie F nur:

Elution: 20 min stehend in 5 ml wassergesättigtem Dichlormethan

Weitere Behandlung: wie H (ohne Celite-Säule)

B-4-37	0.0	1.49	0.0	59.68	3.13	2196	2196
B-4-38	0.0	0.86	0.0	59.68	10.71	676	676
B-4-39	250.0	0.99	1.75	59.6	21.11	296	294.5
B-4-40	250.0	1.39	2.42	59	22.95	285	282.6
B-4-41	500.0	1.25	4.4	59	18.22	361	356.6

K) wie F nur:

Elution: 20 min stehend in 5 ml wassergesättigtem Dichlormethan

Weitere Behandlung: wie F mit Celite Säule.

B-4-42	0.0	2.49	0.0	59.68	35.37	123.6	123.6
B-4-43	0.0	1.23	0.0	59.68	18.04	366	366
B-4-44	250.0	1.85	3.24	59	13.95	501	497.8
B-4-45	250.0	0.48	0.8	59	2.53	2821	2820.2
B-4-46	500.0	1.16	4.06	59	14.28	487.9	483.8

L) wie K nur:

Sorbent: Platten zuvor in drei Systemen vorgereinigt (Systeme wie bei G)

Elution: mit 3 mal 5 ml Dichlormethan

B-34	0.0	8.0	0.0	60.0	8.44	687	687
B-35	0.0	1.0	0.0	60.0	24.4	221.5	221.5

M) wie F nur:

Sorbent: DC-Platten in drei Systemen vorgereinigt (Systeme wie bei G)

Elution: 20 min mit 5 ml aqua bidest. stehend eluiert, 2 mal mit je 1 ml aqua bidest nacheeluiert

Weitere Behandlung: nach Eindampfen in 1 ml Äthanol aufgenommen

B-36	0.0	47.4	0.0	60.0	39.17	100.2	100.2
------	-----	------	-----	------	-------	-------	-------

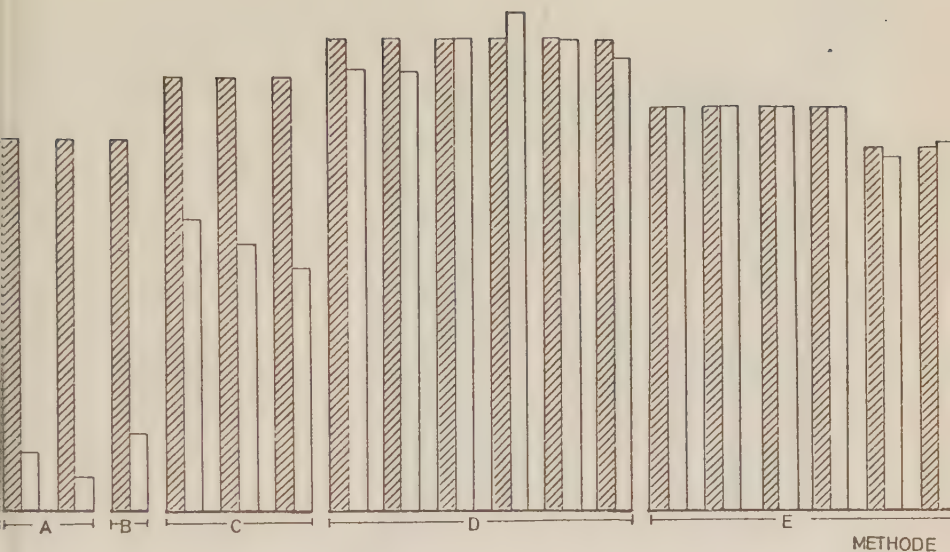


Abb. 19a: Einfluß verschiedener papierchromatographischer Systeme auf die Blank-Entstehung

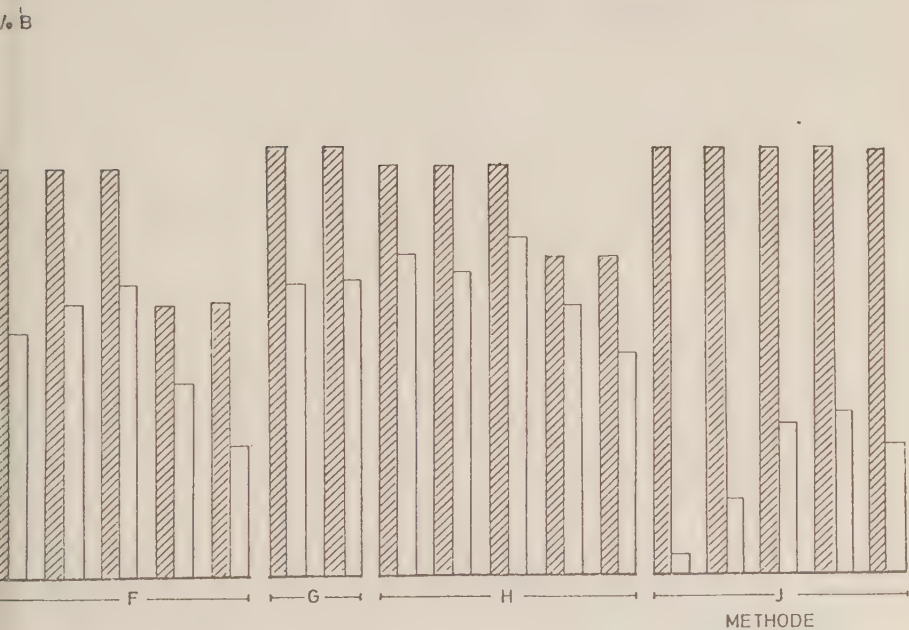


Abb. 19b: Einfluß verschiedener dünnstichtchromatographischer Systeme auf die Blank-Entstehung



Abb. 19c: Einfluß verschiedener dünnschichtchromatographischer Systeme auf die Blank-Entstehung (Fortsetzung)

2.3. Auswertung

Elution mit Äthanol treten in allen untersuchten Modifikationen mehr oder minder beträchtliche Blanks auf. Eine Reduzierung dieses Blanks ist sowohl bei der DC als auch bei der PC möglich, wenn man zur Elution Wasser an Stelle von Äthanol verwendet. (B; C; H) Eine vollständige Blank-Eliminierung gelang jedoch nur, wenn auch das Aufnehmen des Abdruckrückstandes mit Äthanol unterblieb. (D; E)

Wassergesättigtes Dichlormethan ist als Elutionsmittel für Aldosteron vollkommen ungeeignet, da einerseits nur minimale Ausbeuten erzielt werden und andererseits extrem hohe Blanks resultieren. (I; K; L)

Vergleich der Modifikationen G mit der Modifikation F zeigt, daß vor- und nachträgliches Waschen der DC-Platten hilfreich sein kann, einen Blank zu reduzieren, dies jedoch offensichtlich nur dann, wenn das verwendete Elutionsmittel nicht selbst Ursache eines überhöhten Blanks ist, wie im Falle von Dichlormethan. (K; L)

Nachträgliche Filtration des Eluates über Celite-Säulen, Fritten oder Glaswolle-Säulen scheint wenig Einfluß auf die Höhe des Blank zu haben. Dies war in keinem Falle in der Lage den Blank zu eliminieren. Der Vergleich der Modifikationen D und E zeigt, daß eine nachträgliche Reinigung des Eluates über eine Glaswolle-Säule mit Sicherheit überflüssig ist, wenn das Elutionsmittel Blankfreiheit gewährleistet.

Statische Elution ohne Schütteln ist günstiger als Schütteln während der Elution.

Aus diesen Resultaten lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

Der Versuch, einen einmal entstandenen Blank durch nachfolgende Maßnahmen wieder eliminieren zu wollen, ist wenig aussichtsreich. Die Problemlösung scheint vielmehr in der primären Verhinderung der Blank-Entstehung zu liegen. Wichtigste Maßnahme hierfür ist die Auswahl eines schonenden Elutionsmittels. Wasser ist offensichtlich ein solches Elutionsmittel, das zudem den Vorteil besitzt, Aldosteron ähnlich gut wie Äthanol zu lösen. Ein Problem bei der Elution mit Wasser ist das Einengen: Da die Eluate wegen der Thermolabilität des Aldosterons nicht erhitzt werden dürfen, Wasser aber kaum flüchtig ist, wird das Einengen zu einer sehr langwierigen Prozedur. Wir engen die Eluate in den Inkubationsgefäßen zugleich mit den

Eichkurvenansätzen über Nacht im Vakuum-Exsikkator über P_2O_5 ein. Weiterhin ist auf Grund des Vergleiches der Experimente C und E zu vermuten, daß sich bereits der Kontakt des Eluates mit organischen Lösungsmitteln Blank-fördernd auswirkt. Nur durch den vollkommenen Verzicht auf organische Lösungsmittel nach der Chromatographie gelang es, den Blank vollständig zu eliminieren.

1.11. Kalkulation der Ergebnisse

1.11.1. Graphische Auswertung des RIAs

Aus der im Überstand der Inkubationsansätze von Eichreihe, Proben und Leerwerten gemessenen Radioaktivität und der zu Beginn des RIAs zugesetzten Gesamttraceraktivität " T_{100} " wird zunächst der Anteil der Antikörper-gebundenen Radioaktivität ($\%B$ = Radioaktivität im Überstand) nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gl. 8} \quad \%B = \frac{B \times 100 \times b}{T_{100} \times c}$$

B = Meßwerte der Radioaktivität im Überstand in cpm

T_{100} = zu Beginn des RIAs zugesetzte Gesamttraceraktivität in cpm

b = Gesamtvolumen des Überstandes in ml (normalerweise 1 ml)

c = Teilvolumen des Überstandes, das zur Messung eingesetzt wurde in ml (normalerweise 0,5 ml)

Aus den $\%B$ -Werten der Eichreihe ($\%B_{0 \text{ pg}}$; $\%B_{20 \text{ pg}}$; $\%B_{50 \text{ pg}}$ etc.) wird das arithmetische Mittel für jeden Dosispunkt berechnet und linear als Funktion der ebenfalls linear aufzutragenden Aldosterondosis gezeichnet. Es ergibt sich dann eine in Abb. 20 a dargestellte typische "lin-lin-Eichkurve". Wählt man eine "lin-log-Darstellung", in der die Aldosterondosis logarithmisch aufgetragen ist, erhält man eine Kurve wie in Abb. 20 b. Beide Darstellungen sind zur graphischen Ermittlung der Aldosterondosis in den Proben gut geeignet. Durch Ablesen der mit dem $\%B$ -Wert der Probe korrespondierenden Dosis ergibt sich die Dosis pro Ansatz (A) in pg.

$$\text{Gl. 9} \quad A = \text{pg Aldosteron} / n \text{ } \mu\text{l}$$

n = Teilvolumen des Eluates, das zur Inkubation verwendet wurde

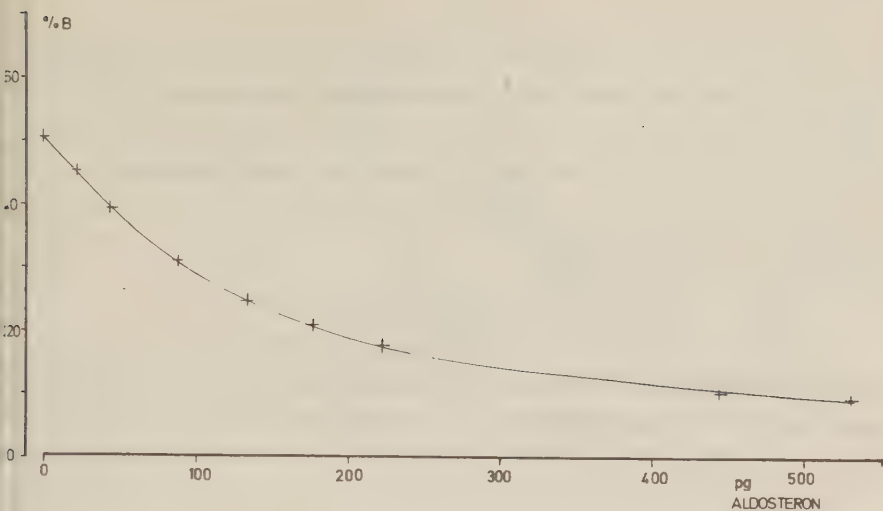


Abb. 20a: Typische Eichkurve des Aldosteron-Radioimmunoassays in lin-lin-Darstellung zur graphischen Auswertung von Radioimmunoassay-Probenergebnissen

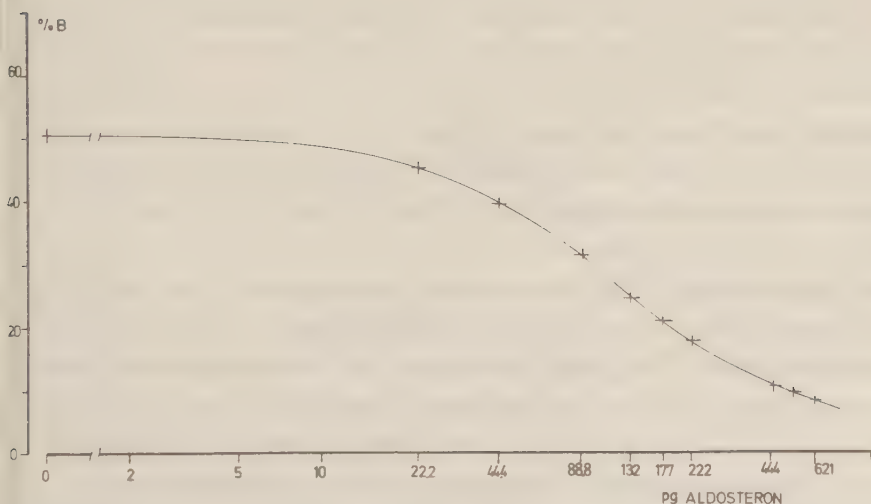


Abb. 20b: Die gleiche Eichreihe wie in Abb. 20a hier in halblogarithmischer Darstellung

Um aus der Dosis pro Ansatz auf die Gesamtmenge Aldosteron (P) in der extrahierten Plasmaprobe zurückzurechnen, ist eine Extrapolation auf das Gesamtelutionsvolumen und eine Ausbeutekorrektur notwendig:

$$\text{Gl. 10} \quad P \text{ (pg)} = \frac{A \times a \times \text{Rec.}}{n \times 100}$$

Rec. = % Wiederfindung im Eluat (vgl. Gl. 1)

a = Gesamtelutionsvolumen in μl

n = für den Assay eingesetztes Elutionsvolumen in μl

Die Plasmaaldosteronkonzentration (P) in pg/ml ergibt sich durch Division von P durch das extrahierte Plasmavolumen (V) in ml.

$$\text{Gl. 11} \quad \text{PA (pg/ml)} = \frac{P}{V}$$

1.11.2. RIA-Auswertung durch elektronische Datenverarbeitung (EDV)

Zur routinemäßigen Auswertung größerer RIA-Serien empfiehlt sich der Einsatz einer EDV-Anlage. Voraussetzung hierfür ist, die Eichkurven durch geeignete Transformation der beiden Variablen Dosis und %B so zu verändern, daß sie durch eine mathematische Gleichung faßbar wird. RODBARD(1974), EKINS(1972^{1,2}), BERSON&YALOW(1968, 1970) und verschiedenen anderen Autoren gelang es, RIA-Eichkurven durch Logit-Log-Transformation zu linearisieren, so daß sie durch eine Geradengleichung dargestellt werden können.

Weitere Möglichkeiten zur mathematischen Erfassung von RIA-Eichkurven bestehen in der Approximation durch eine gewichtete oder ungewichtete Spline-Funktion(MARSCHNER, 1974), in der arc-sin-Transformation und der sinh-Transformation.

Ein Vergleich der Validität verschiedener mathematischer Transformationen und Approximationen zur Kalkulation von RIA-Ergebnissen wurde kürzlich von SINTERHAUF et al.(1974) vorgetragen. Die zuverlässigsten Ergebnisse werden danach mit der Spline-Approximation errechnet. Dennoch bietet sich die Logit-Log-Transformation in vielen Fällen für den Routinegebrauch an, weil sie mit ausreichender Genauigkeit auch auf Tischcomputern mit beschränkter Speicherkapazität(z.B. HP 9820 A, 1.4 kbyte) gerechnet werden kann.

Die Logit-Funktion eines Wertes y ist der natürliche Logarithmus des Quotienten $y / 1-y$:

$$\text{Gl. 12} \quad \text{Logit } y = \ln \frac{y}{1-y}$$

Zur Transformation der Eichkurve ist an Stelle von $y \frac{B}{B_0}$ einzusetzen.

$$\text{Gl. 13} \quad \text{Logit } \frac{B}{B_0} = \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} = \ln \frac{B}{B_0 (1 - B/B_0)} = \ln \frac{B}{B_0 - B}$$

Berechnet man $\text{Logit } B/B_0$ auf diese Weise für alle Aldosteron-Dosispunkte der Eichreihe, und trägt man die Resultate als Funktion des dekadischen Logarithmus der zugehörigen Aldosterondosis auf, so erhält man eine Gerade deren Kenngrößen D (Steigung) und Z (Ordinatenabschnitt) sich durch die Prüfung auf lineare Regression berechnen lassen.

Durch analoge Transformation der Meßwerte B der Proben in die Logit-Form kann $\log$ Dosis und durch Delogarithmieren die Dosis / Ansatz (A) direkt aus der Gleichung der Regressionsgeraden berechnet werden.

Die Transformation einer Eichkurve in die Logit-Log-Gerade ist in Abb 20 c

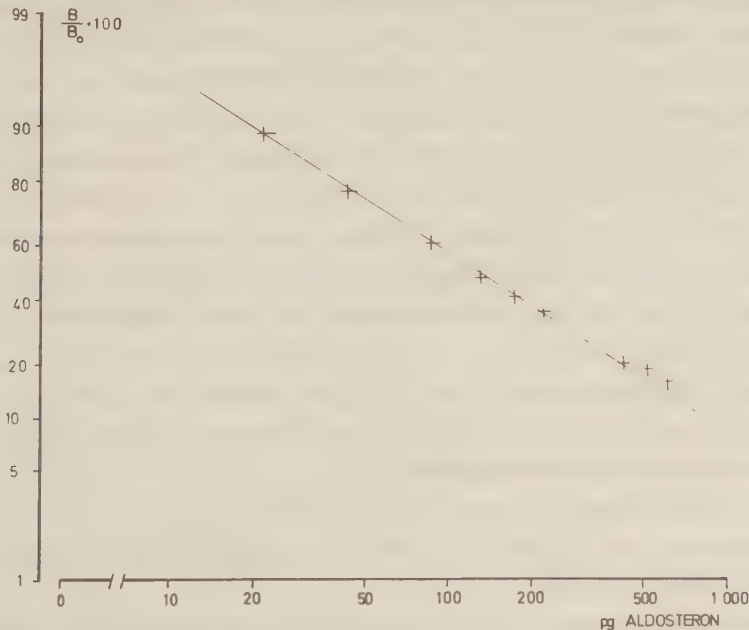


Abb. 20c: Die gleiche Eichreihe wie in Abb. 20a hier in Logit-Log-Transformation für die Computerauswertung von Probenergebnissen

dargestellt.

Die Validität der Logit-Log-Transformation wurde durch einen Vergleich von graphischer Auswertung und mathematischer Auswertung auf einem HP-9820 A Tischrechner nachgewiesen. (Tab. 18)

Die Übereinstimmung der ermittelten Plasmaaldosteronkonzentrationen ist im mittleren und oberen Dosisbereich gut. Im unteren Dosisbereich können größere Abweichungen vorkommen. (mittlere prozentuale Abweichung nach Gl. 14 : 2.6%)

Nach Abschluß der Entwicklungsphase dieser Methode wurden alle RIA-Ergebnisse mit Hilfe des Logit-Log-Transformationsverfahrens auf dem Tischcomputer ausgewertet. Ein Computerprogramm, das eigens auf die Bedingungen der hier beschriebenen Aldosteron-RIA-Methode zugeschnitten ist, wurde in unserem Labor entwickelt.

Nach Eingabe der Werte für T_{100} , $B_{0\text{ pg}}$, Dosis und zugehöriges B wird %B für die Dosispunkte der Eichreihe, die Steigung D, der Achsenabschnitt Z und der Korrelationskoeffizient R der Regressionsgeraden ausgedruckt. Die Qualität der Eichreihe ist auf Grund des Korrelationskoeffizienten, welcher über 0.99 liegen sollte, zu beurteilen. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so ist die Eichkurve auf Grund der %B-Werte in der lin-lin-Darstellung zu zeichnen und nach "Ausreißern" zu suchen. Kann ein einzelner Ausreißer für den schlechten Korrelationskoeffizienten verantwortlich gemacht werden, so darf die Kurve nach nochmaliger Berechnung ohne den Ausreißer verwendet werden, wenn R dann über 0.99 liegt. Ist der Kurvenverlauf dagegen insgesamt atypisch, so ist die Anwendung der Eichkurve auszuschließen! Die Kalkulation der Probenergebnisse erfolgt dann durch Eingabe der Werte für "100% v.E.", m, n, B, W und V. Nach Gl. 8 bis 11 werden die Dosis/Ansatz(A) in pg, die Recovery/ 100 μ l in %, die Aldosteronmenge P in der extrahierten Plasmaprobe in pg und die Plasmaaldosteronkonzentration PA in pg/ml berechnet und ausgedruckt.

Die berechneten Resultate sind nur dann zu verwenden, wenn:

1. Die Recovery/ 100 μ l größer als 1.786 % ist (entsprechend einer Gesamtwiederfindung von 25%).
2. Die Dosis/Ansatz größer als die doppelte Sensitivitätsgrenze der Eichkurve ist. (vgl. hierzu Absch. 1,6, 13.4.)

Tab. 18 : Vergleich von graphischer Auswertung (G) an Hand einer lin-lin-Darstellung und Computerauswertung mit Logit - Log-Transformation (C)

%B	pg / Ansatz		pg / ml		% Differenz (G= 100%)
	G	C	G	C	
P-1 32.09	120	127.5	397.3	421	+ 6.0
48.24	37.5	38.9	310.4	321.6	+ 3.6
P-2 39.89	76	76.7	324.1	326.4	+ 0.7
53.98	16	18.6	227.4	264.1	+16.1
P-3 36.57	95	95.9	377	380.2	+ 0.8
45.4	48	50.4	307.4	333.1	+ 8.4
P-4 38.36	83	85.1	350.2	360.5	+ 2.9
45.19	50	51.3	351.6	360.5	+ 2.5
P-5 47.51	40	41.7	129.7	135.1	+ 4.2
58.57	5	4.2	40.5	34.1	-15.8

$$m_{\text{arithm.}} = 6.1 \pm 5.7(\text{SD})$$

mittlere prozentuale Abweichung = 2.6 %

Gl. 14 mittlere prozentuale
Abweichung

$$= \frac{\sqrt{\sum (\% \text{ Diff.})^2}}{n}$$

n = Zahl der Proben

2. ERGEBNISSE

2.1. Zuverlässigkeitsprüfung der gesamten Methode

Alle Zuverlässigkeitsprüfungen erfolgten unter den in Absch. 3.3. genannten methodischen Bedingungen. Modifikationen, wie sie in den Abschnitten über die Entwicklung der Methode wiederholt beschrieben sind wurden nicht in die Bewertung einbezogen.

2.1.1. Die Richtigkeit der Methode

Die Richtigkeit der gesamten Methode wurde auf dreierlei Weise geprüft:

2.1.1.1. Analyse von PI asmen mit Aldosteronzusatz unter Intra-Assay-Bedingungen

Ca. 400 ml Plasma eines ambulanten Blutspenders unter ad lib. Diät wurden in 5 ml Portionen verteilt. Der größte Teil dieser Plasmaproben wurde für die routinebegleitenden Zuverlässigkeitskontrollen unverändert als Stammpool I eingefroren. 20 Proben wurden mit je 44,4 pg Aldosteron pro ml Plasma aufgestockt, gemischt und anschließend ebenfalls eingefroren. (Pool II) Analog wurden Pool III und IV mit 195,36 resp. 444 pg Aldosteronzusatz/ml Plasma hergestellt und eingefroren. Vier Proben jedes Richtigkeitspools wurden dann in einer Serie zusammen analysiert.

Ergebnisse und Auswertung: (Tab. 19)

15 Assays des Stammpools I ergaben eine mittlere Aldosteronkonzentration von $36,03 \pm 5,59$ (SD) pg/ml. Die mittleren Aldosteronkonzentrationen der drei weiteren Poolplasmen wurden mit $91,66 \pm 12,8$ (SD) pg/ml (Pool II), $242,84 \pm 17,26$ (SD) pg/ml (Pool III) und $534,95 \pm 36,37$ (SD) pg/ml (Pool IV) bestimmt.

Als Kriterium der Richtigkeit legten wir die Übereinstimmung zwischen zugesetzter Aldosteronmenge in den Poolplasmen II, III und IV (= Soll -Differenz) und der Ist-Differenz zwischen dem Mittelwert $\bar{x}$ der Analysenergebnisse für den unveränderten Stammpool und den Mittelwerten $\bar{y}$ der Analysenergebnisse jedes Zusatzplasmas zu Grunde.

normal berechnet sich die "Ist-Differenz" nach der Gleichung 15

$$1. 15 \quad \bar{y}^I = \bar{y}_x - \bar{a}$$

obei: $\bar{y}_x$ die mittlere gemessene Aldosteronkonzentration (pg/ml) des Poolplasmas mit x pg Aldosteronzusatz pro ml Plasma
 $\bar{a}$ die mittlere gemessene Aldosteronkonzentration des zugehörigen Stamm pools
 $\bar{y}^I$ die Ist-Differenz in pg/ml
 x die Soll-Differenz in pg/ml ist.

Weiterhin wurde die mittlere Sollabweichung von $\bar{y}^I$ in % gegenüber x (=100%) berechnet. Diese mittlere Sollabweichung kann als direktes Maß der Richtigkeit der einzelnen Analyse in dem jeweils untersuchten Konzentrationsbereich gelten.

Die wurde bei Pool II (44.4 pg/ml) mit 31.77%, bei Pool III (195.36 pg/ml) mit 7.33% und bei Pool IV (444 pg/ml) mit 13.0 % berechnet.

In Abb. 21 A wurden die Ist-Differenzen $\bar{y}^I$ als Funktion der zugesetzten Aldosteronmenge/ml x dargestellt. Die Berechnung der linearen Regression durch die gezeichneten Punkte ergab folgende Geradengleichung:

$$\bar{y}^I = 1.11 x - 4.22 \quad R = 0.9961$$

Diese Gerade hat nahezu die Steigung 1 und ihr Schnittpunkt mit Ordinate und Abszisse liegt nahe dem o/o Punkt. Somit ist die Idealbedingung der Richtigkeit $\bar{y}^I = x$ in hoher Näherung erfüllt.

1.1.2. Analyse von Plasmen mit Aldosteronzusatz unter Inter-Assay-Bedingungen

Seit Beginn des Einsatzes dieses Aldosteron-RIAs in der klinischen Diagnostik Mitte 1973 wurden in regelmäßigen Abständen Richtigkeitskontrollplasmen zusammen mit Routineserien analysiert. Für diese laufenden Richtigkeitskontrollen wurde Plasma eines ambulanten Blutspenders unter d. lib. Diät. verwendet, welches in drei getrennt portionierten Pools eingefroren war:

Pool V = unveränderter Stamm pool ohne Zusatz
 Pool VI mit 100 pg Aldosteronzusatz pro ml Plasma
 Pool VII mit 300 pg Aldosteronzusatz pro ml Plasma

Die Analysen wurden jeweils mit ca. 5 ml Plasma als Doppelassay durchgeführt.

Die über einen Zeitraum von ca. 15 Monaten gewonnenen Analysenergebnisse der routinebegleitenden Zuverlässigkeitskontrollen sind in Tab. 20 wiedergegeben.

Die Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte wie bei der zuvor beschriebenen Richtigkeitskontrollserie.

In 19 Assays des Stammpools V wurde eine mittlere Aldosteronkonzentration von $44,5 \pm 7,0$ (SD) pg/ml ermittelt. Die Aldosteronkonzentration in Pool VI betrug im Mittel $152,3 \pm 28,5$ (SD) pg/ml ($n = 25$). In Pool VII wurden $369,7 \pm 63,6$ (SD) pg/ml ($n = 20$) gemessen.

Die mittlere Sollabweichung der Analysen des Pools VI betrug 2,9%, diejenige des Pools VII 2,35%.

In Abb. 21 B wurden wiederum die Ist-Differenzen $\bar{y}^I$ als Funktion der zugesetzten Aldosteronmenge/ml Plasma aufgetragen. Für die Regressionsgerade wurde die Gleichung

$$\bar{y}^I = 0,978 x + 0,626$$

berechnet.

Die auffallend geringen mittleren Sollabweichungen der Richtigkeitskontrollen aus verschiedenen Assays dürften hauptsächlich auf die größeren zugrunde liegenden Analysenzahlen zurückzuführen sein. Dadurch werden statistische Abweichungen der Einzelanalysen weitgehend ausgeglichen. Geht man davon aus, daß die einzelnen Analysenergebnisse nach Art einer Normalverteilung um den tatsächlichen Meßwert verteilt sind, so ist die Sollabweichung des Mittelwertes eines großen Analysenkollektivs tatsächlich ein Maß für die Richtigkeit der Methode.

Demnach ist in dem diagnostisch wichtigen Bereich von 111 bis 333 pg/ml bei ausreichend großer Analysenzahl mit einer Abweichung des Analyseergebnisses vom richtigen Wert in Höhe von 2,3 bis 2,9 % zu rechnen. Die Methode liefert also in hohem Maße richtige Ergebnisse.

Tab. 19 : Ergebnisse der Richtigkeitskontrolle unter Intra-Assay-Bedingungen sowie der Richtigkeits- und Präzisionskontrolle bei Analyse verschiedener Volumina eines Poolplasmas mit niedrigem Aldosteron Gehalt ($PA_m = 36,03 \text{ pg/ml}$)

Stammpool I ohne Zusatz			Pool II +44.4 pg/ml	Pool III + 195.36 pg/ml	Pool IV + 444 pg/ml
$PI_{Vol.}^{1)}$ (ml)	pg/ml	pg/Pr	pg/ml	pg/ml	pg/ml
4.2	40.87	171	94.79	241.64	555.22
4.2	23.64	95	107.07	221.21	575.93
4.3	26.85	115	76.29	245.20	502.95
4.3	38.99	167	88.77	263.32	505.71
4.3	35.44	152			
2.5	44.51	111			
2.5	44.07	102			
2.5	36.67	91.5			
10.0	33.24	332.4			
10.0	37.71	377.1			
10.0	37.60	376.0			
15.0	35.13	526.5			
15.0	32.88	493.2			
15.0	34.60	519			
15.0	38.38	575.7			
N	15		4	4	4
MW	$a_2 = 36.03 \text{ pg/ml}$		$y_{44} = 91.66 \text{ pg/ml}$	$y_{195} = 242.84 \text{ pg/ml}$	$y_{444} = 534.95 \text{ pg/ml}$
SD $\pm$	5.59		12.80	17.26	36.37
Intra-Assay					
VK	15.5 %		13.9 %	7.10 %	6.79 %
Ist-Diff. $\bar{y}^1$	-		55.63 pg/ml	206.81 pg/ml	498.92 pg/ml
mittlere					
Sollab-	-		31.77 %	7.33 %	13.0 %
weichung:					

1) Die Volumenangaben beziehen sich nur auf den Stammpool I. Alle anderen Analysen wurden einheitlich mit 5 ml Plasma ausgeführt.

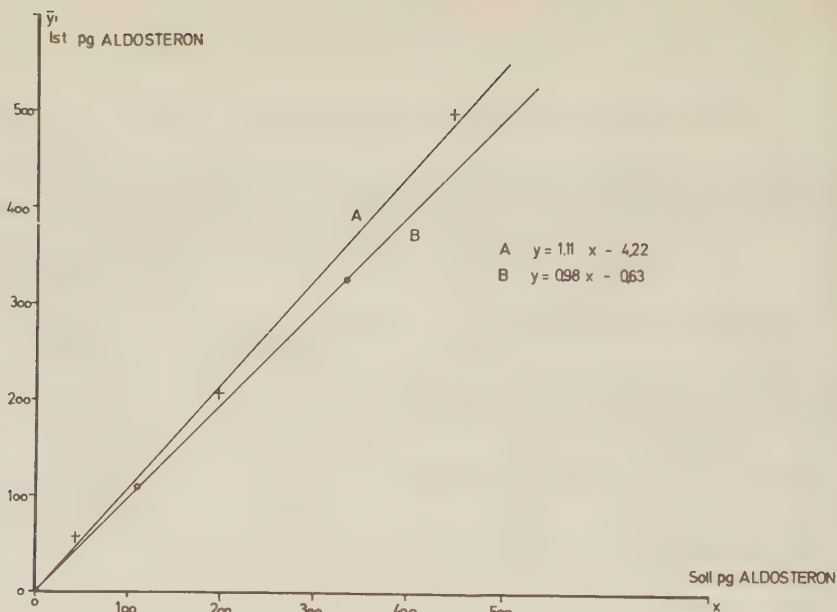


Abb. 21: Richtigkeitskontrolle bei Plasmen mit Aldosteronzusatz unter Intra-Assay-Bedingungen(A) und unter Inter-Assay-Bedingungen(B)

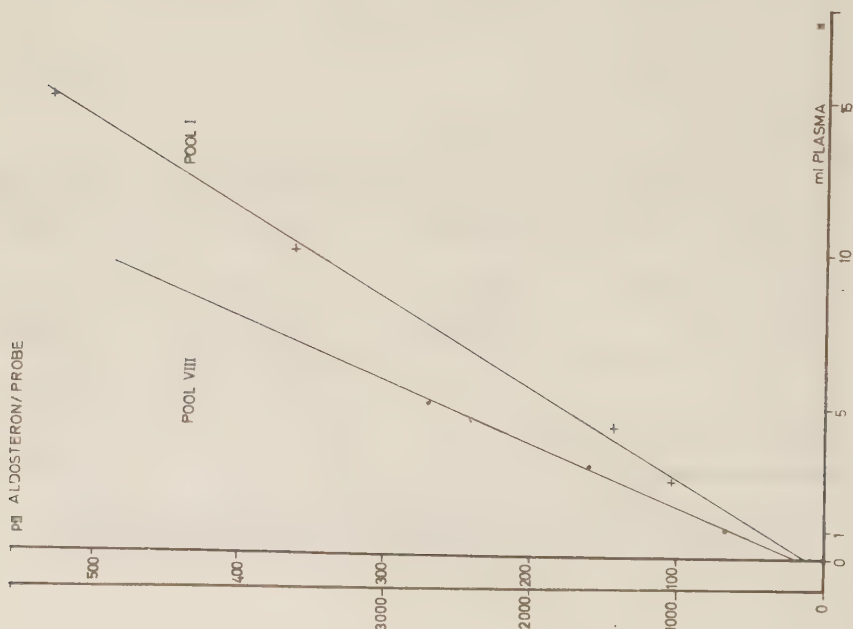


Abb. 22a: Proportionalitätsprüfung bei Analyse steigender Volumina von Poolplasmen mit geringem (36,03 pg/ml) und hohem (500,1 pg/ml) Aldosterongehalt

Tab. 2o : Richtigkeits- und Präzisionskontrolle in Begleitung der Routine
über 15 Monate

	Stammpool V ohne Zusatz		Pool VI +111 pg/ml		Pool VII +333 pg/ml	
	pg/ml		pg/ml		pg/ml	
	59.8	57.4	119.6	118.6	347	370
	44.3	35.4	113.5	97.3	373	399
	48.4	49.0	144.6	153.7	304	289.4
	46.8	54.4	162.4	178.3	225.2	232.4
	37.9	34.7	193.3	152.3	383.9	376.3
	42.0	44.5	154.3	142.2	371.8	374.5
	42.6	41.7	156.8	157.9	379.7	384.2
	40.0	35.4	102.9	97.9	426	432
	42.7	43.3	171.8	182.1	413	408
	45.6		178.9	175.4	462	443
			188.6	165.0		
			166.0	175.0		
			159.0			
n	19		25		20	
MW	$a_1 = 44.5 \text{ pg/ml}$		$y_{111} = 152.3 \text{ pg/ml}$		$y_{333} = 369.7 \text{ pg/ml}$	
SD $\pm$	7.0		28.5		63.6	
VK	15.78%		18.74%		17.19%	
Ist-Differenz $\bar{y}_1$	-		107.8 pg/ml		325.2 pg/ml	
mittlere	-		2.9%		2.35%	
Sollabweichung	-					

2. 1. 1. 3. Richtigkeits- und Präzisionskontrolle bei Analyse verschiedener Volumina von Poolplasmen mit niedrigem und hohem Aldosteron Gehalt (Proportionalitätsprüfung)

Um den Einfluß unterschiedlicher Plasmamengen auf die Richtigkeit und Präzision der Methode zu prüfen, wurden 2.5 , 4.3 , 10.0 und 15 ml eines Plasmas mit geringem Aldosteron Gehalt ($m = 36.03 \text{ pg/ml}$) und 1 , 3 und 5 ml eines Plasmas mit hohem Aldosteron Gehalt (333 pg/ml) Aldosteronzusatz analysiert.

Ergebnis: (Tab. 19 Spalte 1, Tab. 21 und 22a/b)

Bei den Analysen des Poolplasmas mit geringem Aldosteron Gehalt (36 pg) traten beträchtliche Abweichungen vom Mittelwert auf. (Abb. 22a), wenn nur 2.5 oder 4.3 ml Plasma zur Analyse eingesetzt wurden. (VK=10.55 und 22.82%) In 10 und 15 ml Plasmaextrakt konnte auch diese geringe Aldosteronkonzentration mit annehmbarer Präzision (VK = 7.0 und 6.5 %) gemessen werden (Abb. 22a).

Legt man für die Beurteilung der Richtigkeit wieder die mittlere Aldosteronkonzentration aus allen Analysenergebnissen zu Grunde. und vergleicht damit die Mittelwerte $\bar{z}$ mehrfacher Bestimmungen mit einem bestimmten Volumen, so kommt man zu ähnlichen Ergebnissen wie bei der Präzisionsprüfung. Die mittlere Sollwertabweichung beträgt bei den Analysen mit 2.5 ml 20.5%, mit 4.3 ml 10.35% und bei Analysen mit 10 bzw. 15 ml 0.41% und 2.13 %.

In Abb. 22a wurden die mittleren Analysenergebnisse als Funktion des eingesetzten Plasmavolumens gezeichnet.

Die Analyse verschiedener Volumina des Poolplasmas VIII mit hoher Aldosteronkonzentration($m= 500.1 \text{ pg/ml}$) führte zu folgendem Ergebnis: Die Richtigkeit der mittleren Analysenresultate ausgedrückt durch die Sollabweichung des Mittelwertes eines Kollektivs vom Mittelwert des Gesamtkollektivs, ist mit allen drei getesteten Volumina recht gut. (1 ml : 3.2% ; 3 ml : 0.52% ; 5 ml : 4.2%) . Dagegen ist die Reproduzierbarkeit bei Verwendung von nur 1 ml Plasmaextrakt nicht zufriedenstellend. (VK = 20.2%), Bei 3 und 5 ml aber tolerabel (VK = 11.9 und 12.5%).

Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Analysenergebnisse und die Regressionsgerade der mittleren gemessenen Aldosteronmengen sind in Abb. 22b/c

dargestellt¹⁾

Tab. 21 : Richtigkeits- und Präzisionskontrolle mit verschiedenen Volumina eines Poolplasmas mit geringem Aldosteron-gehalt ($m = 36.03 \text{ pg/ml}$) – Auswertung –

n	x=Pl. vol. (ml)	$\bar{y} = \text{Aldo/Probe}$ (pg)	$\bar{z} = \text{Aldo/ml} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	VK %	mittlere Sollabweichung (%) ¹⁾
3	2.5	104.37	41.75	4.4	10.55
5	4.2	142.54	33.15	7.5	22.82
3	10.0	361.83	36.18	2.5	7.0
4	15.0	528.70	35.24	2.3	6.5

Tab. 22 b : Auswertung der Richtigkeits- und Präzisionskontrolle mit verschiedenen Volumina eines Poolplasmas mit hohem Aldosteron-gehalt ($m = 500.1 \text{ pg/ml}$)

9	1.0	484.9	484.9	97.9	20.2	3.2
10	3.0	1508.1	502.7	60.3	11.9	0.52
7	5.0	2605.5	521.1	65.6	12.5	4.2

Tab. 22 a : Ergebnisse der Richtigkeits- und Präzisionskontrolle mit verschiedenen Volumina eines Poolplasmas mit hohem Aldosteron-gehalt ($m = 500.1 \text{ pg/ml}$)

Plasmavolumen (ml)	Aldosteronkonzentration (pg/ml)						
1.0	349.1	602.3	606.7	322.8	482.7	540.5	472.7
	488.2	499.9					
3.0	392.9	559.1	564.4	412.9	515.1	575.7	508.8
	507.0	494.5	497.2				
5.0	561.4	540.3	410.8	550.8	446.4	552.1	586.4

$$1) \text{ mittlere Sollabweichung (\%)} = \frac{\sqrt{(z - m)^2} \times 100}{\bar{z}}$$

m = mittlere Aldosteronkonzentration = "richtiger Wert" des Poolplasmas

$\bar{z}$ = mittlere gemessene Aldosteronkonzentration in einem Kollektiv

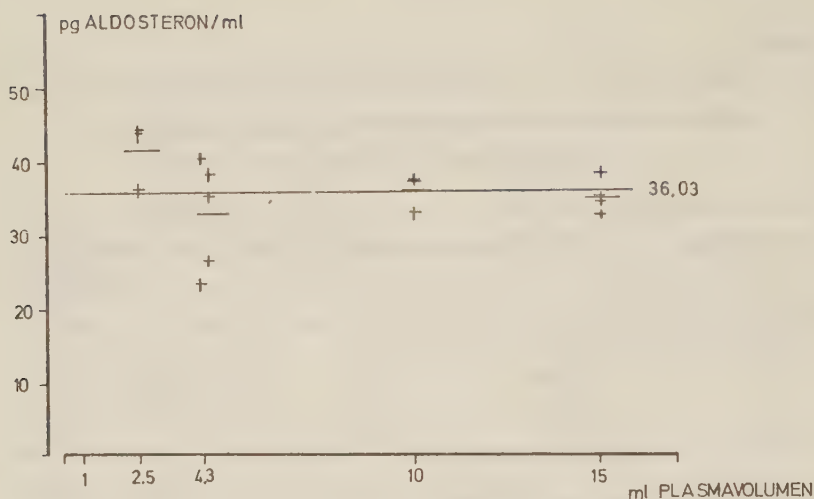


Abb. 22b: Proportionalitätsprüfung bei Analyse steigender Volumina eines Poolplasmas mit geringem (36.03 pg/ml) Aldosterongehalt: Abhängigkeit der Präzision vom Plasmavolumen

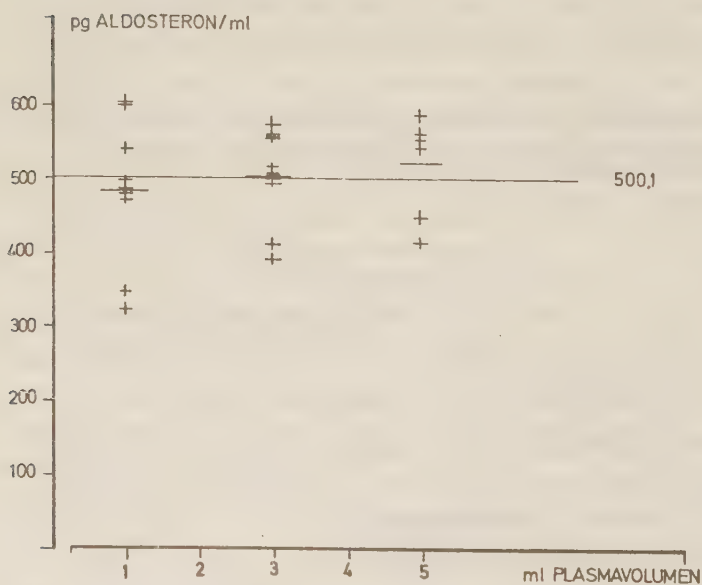


Abb. 22c: Proportionalitätsprüfung bei Analyse steigender Volumina eines Poolplasmas mit hohem (500.1 pg/ml) Aldosterongehalt: Abhängigkeit der Präzision vom Plasmavolumen

1.2.1. Spezifität der Methode

Die Spezifität der Methode läßt sich nicht durch eine bestimmte Kenngröße charakterisieren, wie dies für die Präzision durch die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten, für die Richtigkeit durch Steigung, Achsenverschiebung und Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden möglich ist. Vielmehr ist es notwendig, die Spezifität durch möglichst viele Indizien zu sichern:

Man kann diese Indizien einteilen in:

- A) Experimentelle Prüfungen der spezifitätsbestimmenden Analysenschritte
- B) Prüfung an Hand der klinischen Plausibilität: Korrelierung von physiologischen und pathophysiologischen spezifischen Parametern, die selbst indirekte Aldosteronwirkungen darstellen oder Aldosteronreaktionen auslösen, mit Analyseergebnissen, die unter Einfluß dieser Parameter gewonnen wurden.

Die zweite Gruppe von Indizien liefert zugleich Evidenz für die Übereinstimmung oder zumindest Proportionalität von radioimmunologischer und Bio-aktivität des Aldosterons.

ad A)

2.1.2.1. Die Spezifität des Antiserums

Die Kreuzreaktivität des verwendeten Aldosteron-Antiserums wird von Dr. VECSEI wie folgt angegeben(pers. Mitteilung):

Aldosteron	100 %
Cortisol	0.08 %
Corticosteron	0.28 %
Progesteron	0.1 %
18-OH-Corticosteron	0.004 %
18-OH-DOC	0.12 %
11-OH-Progesteron	0.008 %

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität erfolgte nach der Methode von Abraham (1969).

2.1.2.2. Alkaliwäsche und Papierchromatographie

Die phenolischen Steroide(Östrogene) werden durch die Alkaliwäsche mit 0.1 n NaOH aus dem Extrakt entfernt. (HÜBNER&STAIB, 1965)

Cortisol, Cortison und Corticosteron, die in vielfach höheren Konzentrationen als Aldosteron im Plasma vorkommen, werden durch einmalige Papierchromatographie im Bush B 5 System (BUSH, 1952) bei exakter Durchführung gut abgetrennt. Die Trennung des Aldosterons von F und E wird für jedes Chromatogramm durch mitlaufende Pilotstreifen mit $^3\text{H-E}$, $^3\text{H-F}$ und $^3\text{H-Aldosteron}$ überprüft.

Die eindeutige Isolierung des Aldosterons verdeutlicht das in Abb. 15 wiedergegebene typische Radiochromatogramm, auf dem auch der Bereich eingezeichnet wurde, der für den Assay ausgeschnitten und eluiert wird. Daß trotz der relativ geringen Kreuzreaktivitäten des Antiserums eine chromatographische Reinigung unerläßlich ist, zeigt die folgende Chromatogrammanalyse:

Ein Plasmaextrakt mit $^3\text{H-Aldosteron}$ Verlustindikator wurde in der üblichen Weise auf Wh 1 Papier aufgetragen und nach Imprägnierung ca. 4,5 Std. im modifizierten Bush B 5 System entwickelt.¹⁾ Der Aldosteronbereich wurde an Hand des Standardchromatogramms auf dem Scanner lokalisiert und ausgeschnitten. Darüberhinaus wurde der gesamte Chromatogrammsstreifen in Stücke von 2 cm Länge zerschnitten, die getrennt aber in gleicher Weise wie der Aldosteron-Bereich eluiert und im Doppelassay mit dem Aldosteron-Antiserum analysiert wurden. Außerdem wurde für alle Chromatogrammabschnitte eine Wiederfindungsanalyse des vor der Extraktion zugesetzten $^3\text{H-Aldosterons}$ durchgeführt.

Ergebnis: (Tab. 23)

- a) Es ließ sich nachweisen, daß der weitaus größte Teil (43,52 %) des Aldosterons tatsächlich in dem analysierten Probenbereich lokalisiert war. In allen übrigen Chromatogrammabschnitten konnten zusammenge-

¹⁾ N. b.: In der endgültigen Modifikation der Methode wurde die PC-Trennung und die Wiederfindung durch Äquilibration über Nacht an Stelle der Imprägnierung und ca 7,5 Std. Entwicklungszeit noch weiter verbessert.

ommen nur 6,5% ³H-Aldosteron nachgewiesen werden. Die verwendete Lokalisationstechnik mit Isatin und radioaktiven Pilotstreifen erlaubt den Aldosteronbereich offensichtlich zufriedenstellend.

) Die beträchtliche "absolute Kreuzreaktivität" verschiedener Chromatogrammabschnitte zeigt, daß auf Grund der überwältigenden Menge kreuzreagierender Steroide in den dem Aldosteron benachbarten Chromatogrammabschnitten trotz der geringen "relativen Kreuzreaktivität" des Antiserums selbst (vgl. 2.1.2.1.) bei unzureichender Trennung oder ohne Chromatographie mit erheblichen Fehlern in der Analyse zu rechnen wäre. (Abb. 23)

Tab. 23 : Chromatogrammanalyse

PC-Bereich (cm)	Assay-Vol. (μ l)	Wiederfindg. (%)	Kreuzreaktivität pg/Ansatz ¹⁾	MW absolut (%) ²⁾
2 - 2	500	0,399	95,58	92,67 32,4
	400		89,77	
2 - 4	400	0,558	84,79	88,50 30,9
	400		87,22	
4 - 5,2 (F)	500	3,115	99,62	94,30 33,0
	400		88,98	
5,2 - 7,6 (Aldo)	400	43,52	288,51	285,73 100,0
	400		282,96	
7,6 - 9,6 (E)	500	0,239	131,61	111,61 39,0
	300		91,62	
9,6 - 11,6	500	0,959	147,99	133,42 46,6
	300		118,86	
11,6 - 15,6	500	1,198	67,12	67,12 23,25

¹⁾ An Hand des ermittelten %B errechnete scheinbare Aldosteronmenge
Assayvolumenkorrektur wurde vorgenommen

²⁾ Hier wurde die tatsächliche Kreuzreaktivität jedes Bereiches in % der gemessenen Dosis im Aldosteronbereich (100%) angegeben.

2.1.2.3. Kontrolle unspezifischer Effekte

Da die Eichkurven- und Probenansätze immer unter den gleichen Bedingungen und im gleichen standardisierten proteinhaltigen Medium analysiert werden könnten unspezifische Effekte, wenn überhaupt, dann nur in den Standards im gleichen Ausmaß wie in den Proben auftreten.

2.1.2.4. Blank-Kontrolle

Durch einen Blank-Kontrollversuch über den gesamten Eichkurvenbereich konnte die vollkommene Blankfreiheit der Methode nachgewiesen werden.

Versuch:

In einer Serie von 10 Proben wurde an Stelle von Plasma nur 35 ml aqua bidest. eingesetzt. Die Serie mit diesen 10 Wasser-Blank-Proben wurde bis einschließlich zur Elution genau wie die üblichen Plasmaserien behandelt. Dann wurden abweichend vom normalen Analysengang zwei zunächst identische Eichkurvenansätze hergestellt. Den Ansätzen der Eichkurve I wurden dann unterschiedliche Mengen "Blank-Eluat" zugesetzt, und zwar für jede Aldosterondosis einmal 0,5 ml und einmal 0,2 ml Eluat. Diese mit "Blank-Eluat verfälschten" Eichkurvenansätze wurden dann gemeinsam mit der II. unveränderten Eichkurve inkubiert und gemessen.

Ergebnis:

Zwischen den beiden Eichkurven mit und ohne Blank-Zusätze besteht nahezu Übereinstimmung. (Tab. 24) In 7 von 11 Fällen liegen die mittleren Meßpunkte der Eichkurve mit Blank-Zusätzen sogar innerhalb der 2 SD Abweichung der regulär erstellten Eichkurvenpunkte. (Abb. 20) Darüber hinaus ließen sich keinerlei Unterschiede des Meßergebnisses in Abhängigkeit von der Menge des Eluates feststellen. (Tab. 25) ($p > 0.1$) Die Sensitivität der Eichkurve ist mit 3,8 pg/Ansatz bemerkenswert.

2.1.2.5. Übereinstimmung bei Richtigkeitskontrollen

Die gute Übereinstimmung der mittleren Analysenergebnisse mit den tatsächlichen Aldosteronzusätzen in Richtigkeitsplasmen sind ebenfalls ein Indiz für die Spezifität der Methode. Die Richtigkeit ist das übergeordnete Kriterium.

Tab. 24 : Auswertung des Blank-Kontrollversuches über den gesamten Eichkurvenbereich

Eichkurve: ohne Zusätze					mit Eluat			
Dosis (pg)	MW (cpm)	SD (cpm)	VK %	MW-2SD (cpm)	%B _{MW} %	%B _{MW-2SD} %	MW (cpm)	%B _{MW} %
0.0	1556	6.9	0.45	1542	48.2	47.2	1574	48.76
22.2	1456	1.7	0.12	1453	45.1	44.98	1431	44.32
44.4	1313	23.0	1.75	1267	40.7	39.23	1329	41.17
88.8	1129	14.3	1.36	1101	34.9	34.09	1107	34.27
133.2	966	13.2	1.36	940	29.9	29.10	960	29.74
177.6	821	2.6	0.31	815	25.4	25.25	805	24.94
222.0	714	7.5	1.05	699	22.1	21.65	714	22.11
444.0	434	5.5	1.26	423	13.4	13.10	432	13.39
532.8	361	5.1	1.40	351	11.2	10.87	376	11.65
621.6	320	10.2	3.19	299	9.9	9.27	335	10.36

Vergleich beider Eichkurven(%B_{MW}) im gepaarten T-Test: T = 1347 $\chi^2 = 9$
p > 0.1

Kein signifikanter Unterschied! Somit KEIN BLANK!

Sensitivität der Eichkurve ohne Eluat: 3.8pg

Mittlere Wiederfindung: 52.27%

Tab. 25 : Einfluß der Menge des zugesetzten Leereeluates auf das Ergebnis

Dosis pg	+ 0.5 ml Eluat		+ 0.2 ml Eluat	
	cpm	%B	cpm	%B
0.0	1578	48.87	1540	48.62
22.2	1394	43.18	1468	45.47
44.4	1333	41.29	1329	41.07
88.8	1090	33.76	1123	34.78
133.2	950	29.42	971	30.07
177.6	796	24.65	815	25.24
222.0	723	22.39	705	21.83
444.0	433	13.41	432	13.38
532.8	379	11.74	374	11.58
621.6	335	10.37	334	10.34

Vergleich beider Reihen im gepaarten T-Test: T = 1.241 $\chi^2 = 9$ p > 0.1
Kein signifikanter Unterschied!

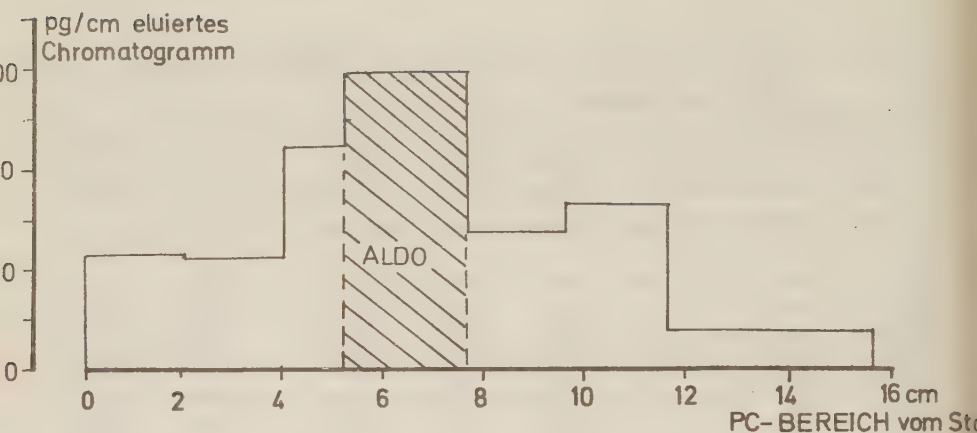


Abb. 23: "Chromatogrammanalyse": Absolute Kreuzreaktivität verschiedener Bereiche eines Papierchromatogramms nach Auftrennung eines Plasmaextraktes, gemessen im Aldosteron-RIA

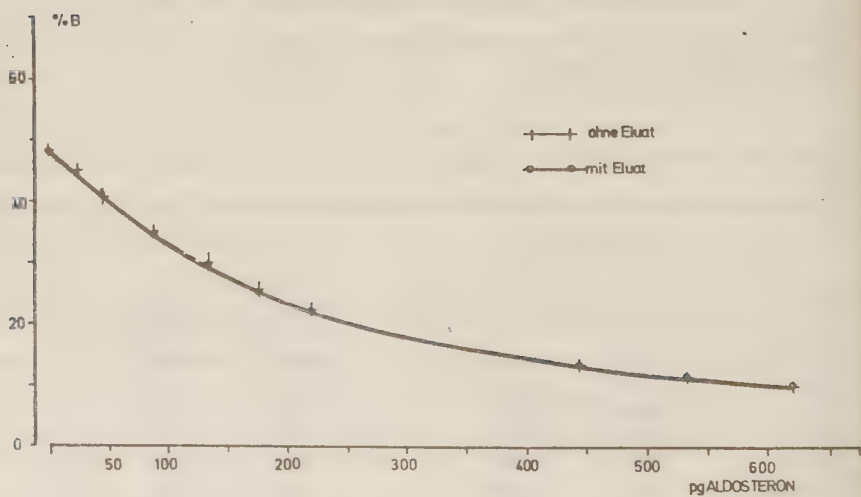


Abb. 24: Blank-Kontrolle: Auswirkung des Zusatzes von H_2O -Chromatographie-Eluat zu Eichkurven-Ansätzen und Vergleich mit einer Kontrolleichkurve

B)

1.2.6. Nachweis der aldosteronspezifischen Orthostasereaktion

Die Veränderung der Körperlage ist ein spezifischer Reiz für die Plasmaaldosteronsekretion. Der Nachweis eines signifikanten Anstieges der Plasmaaldosteronkonzentration beim Übergang von Ruhelage in Orthostase ist somit als biologisches Spezifitätsmerkmal zu werten.

Ein solcher hochsignifikanter Anstieg ließ sich bei 22 Patienten unter lib. Diät ebenso nachweisen ($p < 0.001$) wie bei 12 Patienten unter EBD ($p < 0.001$) und bei 10 Patienten unter NaCl-Belastung ($p < 0.001$). (vgl. Absch. 2.3.)

1.2.7. Nachweis der spezifischen Aldosteronsuppression durch NaCl-Belastung

Bei 10 Patienten wurde die Reaktion des Plasmaaldosterons unter Ruhe- und Orthostasebedingungen nach dreitägiger oraler Belastung mit 10 g NaCl/die untersucht.

Die mittleren Ruhewerte waren mit 33.1 ± 22.9 (SD) pg/ml nicht signifikant ($0.2 > p > 0.1$) gegenüber den Ruhewerten unter EBD (42.2 ± 11.5 (SD) pg/ml) erniedrigt. Die Orthostasewerte unterschieden sich dagegen hochsignifikant: NaCl-Belastung $m = 100.8 \pm 50.1$ (SD) pg/ml; EBD $m = 172.8 \pm 85.1$ (SD) pg/ml ($p < 0.01$) (vgl. auch unter 2.3.1.)

1.2.8. Übereinstimmung der Normalwerte mit Literaturangaben

Normalwertbestimmungen an 10 freiwilligen gesunden Normalpersonen ergaben unter stationären Bedingungen Plasmaaldosteron-Ruhewerte um 8 Uhr von 72.08 ± 44.47 (SD) pg/ml. Nach 3 Stunden Orthostase wurden 230.14 ± 102.52 (SD) pg/ml gemessen. Somit sind als Normalwerte unter klinischen Bedingungen anzunehmen:

nach 8 Std. Ruhe: 20 – 120 pg/ml

nach 3 Std. Orthostase: 100 – 500 pg/ml

Diese Normalwerte stehen in gutem Einklang mit den von anderen Autoren angegebenen Werten. (vgl. Tab. 1c)

2.1.3. Präzision der Methode

Die Reproduzierbarkeit der gesamten Methode wie auch die Reproduzierbarkeit des Assays allein wurden untersucht. (vgl. auch Absch. 1.3.6.)

Um eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Präzisionsprüfung mit denen anderer Autoren sowie der verschiedenen eigenen Präzisionsprüfungen mit unterschiedlichem methodischem Ansatz zu ermöglichen, wurden die Analysen nach ihren Ergebnissen vier Bereichen zugeordnet. (KATZ, 1972) Die Abgrenzung der Bereiche erfolgte nach dem Gesichtspunkt der klinischen Relevanz. Die Bereiche sind aus diesem Grunde verschieden groß und auch im gesamten Probenkollektiv unterschiedlich oft repräsentiert. Eine gewisse Willkür ließ sich bei der Festsetzung der Grenzen natürlich nicht vermeiden.

Bereich I	0 - 50 pg/ml
Bereich II	51 - 250 pg/ml
Bereich III	251 - 1000 pg/ml
Bereich IV	über 1000 pg/ml

2.1.3.1. Die Präzision der Gesamtmethode

Sie wurde auf zwei Arten geprüft, um die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Serie (Intra-Assay-Reproduzierbarkeit) einerseits und die Reproduzierbarkeit bei Mehrfachbestimmungen in verschiedenen Serien (Inter-Assay-Reproduzierbarkeit) andererseits zu testen.

2.1.3.1.1. Intra-Assay-Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode

Prüfmethode:

Mit 70 unselektierten Patientenplasmen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Plasmen wurden nach der Abnahme in zwei Hälften geteilt, die dann getrennt - aber immer in einer Serie - extrahiert und analysiert wurden. Die 70 Doppelbestimmungen erfolgten also jeweils an Hand einer

Eichkurve.

Auswertung:

Die Ergebnisse der 140 Analysen sind im Einzelnen in Tab. 1 des Tabellenanhangs aufgeführt. Die Mittelwerte $\bar{x}$ aller Doppelbestimmungen "A" und "B" und die zugehörigen Variationskoeffizienten wurden berechnet. (Tab. 1 Tabellenanhang) Da in den meisten Fällen von jeder Probe nochmals zwei Assays "c" und "d" durchgeführt wurden, wurde der Mittelwert der Analysenergebnisse $\frac{"c" + "d"}{2}$ für "A" bzw. "B" eingesetzt und zur Berechnung des VK der Doppelbestimmung A/B verwendet. Das Gesamtkollektiv wurde dann wieder auf Grund der errechneten Mittelwerte $\bar{x}$ aus "A" und "B" in vier Bereiche eingeteilt, und schließlich der mittlere VK aller Proben eines Bereiches berechnet. Dabei ergibt sich, daß die Reproduzierbarkeit mit der vorhandenen Aldosteronmenge in der Probe ansteigt. Sie beträgt im Bereich physiologischer Ruhewerte 7.5 % (VK).

Tab. 26 : Mittlere Intra - Assay-Variationskoeffizienten

Bereich (pg/ml)	n(Paare)	VK (%)
I 0 - 50	10	15.97
II 51 - 250	36	7.63
III 251 - 1000	15	4.78
IV über 1000	9	3.44

Das Ergebnis dieser Präzisionsanalyse macht auch deutlich, daß es nicht sinnvoll ist, von "der Präzision des Assays" in toto zu sprechen.

2.1.3.2. Inter - Assay - Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode

Prüfmethode:

64 Proben aus drei verschiedenen Poolplasmen wurden in verschiedenen Serien im Laufe etwa eines Jahres wiederholt analysiert. Die Ergebnisse wurden aus verschiedenen Eichkurven errechnet.

Ergebnisse und Auswertung:

Die Einzelergebnisse der 64 Analysen sind Tab. 20 zu entnehmen. Die arithmetischen Mittelwerte $\bar{x}$ der Einzelanalysen jedes Pools und die dazugehörigen Variationskoeffizienten VK wurden berechnet.

Für Pool I(44.5 pg/ml) ergab sich ein VK von 15.78%, für Pool II(152.3 pg/ml) 18.74% und für Pool III(369.7 pg/ml) 17.19%. Die "mittlere Präzision" aller Analysen betrug 17.23%.

Tab. 27 : Mittlere Inter-Assay-Variationskoeffizienten

Bereich	Pool	Aldo-gehalt (pg/ml)	Analysenzahl n	$\bar{x} \pm SD$ (pg/ml)	VK (%)
I	V	44.5	19	44.5 ± 7.0	15.78
II	VI	152.3	25	152.3 ± 28.5	18.74
III	VII	369.7	20	369.7 ± 63.6	17.19
I - III			64		17.23

2.1.3.2. Die Reproduzierbarkeit des Radioimmunoassays allein

Prüfmethode:

Bei allen PI asmaaldosteronanalysen wurde der eigentliche RIA grundsätzlich doppelt ausgeführt. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Teilmolumina (500 und 200 μ l) des Eluates nach der Papierchromatographie in den RIA eingesetzt. Durch die Verwendung verschiedener Volumina gelangt in jeden RIA unterschiedlich viel Aldosteron aus der Probe, so daß man zwei unterschiedliche Ergebnisse(pg/Ansatz) erhält, die an zwei verschiedenen Punkten ein und derselben Eichkurve abgelesen werden. Nach entsprechender Volumen-und Verlustkorrektur mit Hilfe des Inneren Standards sollte sich theoretisch aus beiden Assayergebnissen das gleiche Analysenergebnis für die Ausgangsmenge Plasma ergeben. Das Maß der Übereinstimmung der Volumen- und Verlust-korrigierten Ergebnisse solcher"Doppel-RIAs" ist Ausdruck der Reproduzierbarkeit des RIAs allein.

Die Berechnung erfolgte analog den zuvor beschriebenen Präzisionsanalysen.

Berechnung des arithmetischen Mittels "A" bzw. "B" der Ergebnisse des Analysenpaares. (= 100%)

Berechnung der prozentualen Abweichung (VK) der beiden Einzelergebnisse von diesem Mittelwert.

Zuordnung aller Mittelwerte zu vier Bereichen (I-IV).

Errechnung der mittleren VK aus allen VK eines Bereiches.

Ergebnisse:

Insgesamt wurden RIA-Ergebnisse von 332 unselektierten Patientenproben, die in verschiedenen Serien analysiert wurden, auf diese Weise retrospektiv untersucht. (Tabellenanhang)

Tab. 28 : Mittlere Intra-Assay-Variationskoeffizienten des Radioimmunoassays allein

Bereich(pg/ml)	n (Analysenpaare)	VK(%)
0 - 50	34	18.89
I 51 - 250	226	6.77
II 251 - 1000	52	3.49
V über 1000	15	3.28

Auswertung:

Die Reproduzierbarkeit des Assays ist in Dosisbereichen über 50 pg/ml (VK 6.77 - 3.28%) auffallend besser als im untersten Dosisbereich. (18.89%)

Interessant ist ein Vergleich der Intra-Assay-Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode mit der Intra-Assay-Reproduzierbarkeit des RIAs allein.

Die Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode ist in den Bereichen II, III und V jeweils nur ein wenig geringer als die des RIAs allein.

Das Ausmaß der Gesamtproduzierbarkeit der Methode ist also offensichtlich hauptsächlich eine Funktion der Präzision des eigentlichen RIAs.

Im Bereich I wurde für den RIA allein eine etwas schlechtere Reproduzierbarkeit als für die Gesamtmethode errechnet. Dieser Befund kann auf Grund theoretischer Überlegungen über die Präzision nicht tatsächlich signifikant sein. Eine direkte Signifikanzprüfung im STUDENT-Test verbietet sich wegen des unterschiedlichen zu Grunde liegenden Materials. Die Erklärung dieses mit theoretischen Überlegungen scheinbar nicht in Einklang zu bringenden Befundes ist jedoch einfach. Bei Betrachtung der Variationskoeffizienten im Einzelnen (Tab. im Anhang) fällt auf, daß insbesondere innerhalb des Bereiches I die VK um so stärker zunehmen, je mehr sich die gemessene Aldosterondosis der Sensitivitätsgrenze nähert. Es gibt also mit Sicherheit keinen konstanten VK innerhalb eines der willkürlich gezogenen Bereiche. Ein Vergleich der mittleren VK zweier Bereiche ist somit nur zulässig, wennn der Berechnung der mittleren VK hinreichend große Analysenkollektive zu Grunde liegen, damit die Heterogenität der Bereiche hinsichtlich der Präzision statistisch nivelliert wird. Gerade diese Bedingung ist aber beim Vergleich der beiden Intra-Assay-VK des Bereiches I (VK - Gesamtmethode : VK- RIA) nicht hinreichend erfüllt. In beiden Kollektiven sind verschieden große Einzeldosen in unterschiedlicher Häufigkeit repräsentiert, was insbesondere bei Ergebnissen in der Nähe der Sensitivitätsgrenze bedeutsam ist.

Aus der Erkenntnis der schlechten Reproduzierbarkeit von Messungen in der Nähe der Sensitivitätsgrenze ist die allgemeine Empfehlung abzuleiten, in der Routine Meßwerte unterhalb der 2,5 fachen Sensitivitätsgrenzdosis eines RIAs nicht zu verwenden.

Beim Vergleich der Intra und Inter-Assay VK fällt auf, daß nur die Intra-Assay VK eine deutliche Abhängigkeit vom Dosisbereich aufweist, während die Inter-Assay-VK relativ unabhängig von der Dosis zu sein scheint.

Eine mögliche Erklärung dieses Befundes könnte in der Auswahl der Prüfpools liegen: Die Unterschiede der Konzentrationen (ca 50, 150 und 350 pg/ml), mit denen die Inter-Assay-Präzision geprüft wurde sind relativ

gering im Vergleich zu den extremen Dosisunterschieden, die in die Intra-Assay-Präzisionsanalyse Eingang gefunden haben. Der geprüfte Dosisbereich 50 – 350 pg/ml ist offensichtlich bezüglich seiner VK viel homogener als etwa der Bereich 0–50 pg/ml. Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von Intra- und Inter-Assay-Präzision ergibt sich aus der Analyse der Reproduzierbarkeit der Eichkurven. (Absch. 1.3.6.) Die Größenordnung der Inter-Assay-VK der Eichkurven ist ähnlich derjenigen für die Proben. Die Reproduzierbarkeit wiederholter Probenassays ist also hauptsächlich eine Funktion der Reproduzierbarkeit der Eichkurve.

2.1.4. Die Sensitivität der Methode

2.1.4.1. Theoretische Sensitivitätsgrenze

Prüfmethode:

Die theoretische Sensitivitätsgrenze wurde entsprechend der Definition von EKINS(1972) aus den Ergebnissen von 35 an verschiedenen Tagen erstellten Eichkurven berechnet. Diese Eichkurven wurden wie folgt analysiert. Es wurde das arithmetische Mittel aus jeweils 3 Messungen von B_0 und die dazugehörige SD der Einzelwerte berechnet. Der Mittelwert wurde dann als authentischer Wert für die Dosis 0 der Eichkurve programmiert. Die übrigen Dosispunkte wurden ebenfalls durch Mittelwertberechnung festgelegt. In den so definierten Eichkurven wurde dann die zugehörige Dosis für $\%B_{MW-2SD}$ bei 0 pg berechnet.

Unter der Annahme, daß die Einzelwerte von $\%B_0$ normal um den MW von $\%B_0$ verteilt sind, entspricht die so berechnete Dosis derjenigen Menge Aldosteron, die mit etwa 95% Wahrscheinlichkeit von der Dosis 0 unterschieden werden kann. Diese Dosis wird als Sensitivitätsgrenze angenommen.

Die analysierten Eichkurven wurden auf Grund der Abhängigkeit der Sensitivität von $\%B_0$ nach ihrem mittleren $\%B_0$ Wert in zwei Kollektive unterteilt.

Tab. 29 : "Theoretische Sensitivitätsgrenzen" der Eichkurven (EKINS):

Berechnung der minimalen meßbaren Menge

Eich- kurve	----- x ₁	B ₀ x ₂	pg x ₃	----- x̄	SD	1)	%B _{x̄}	%B _{x̄-2SD}	Sensitivi- tätsgrenze pg
	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm				
S-D	1415	1471	1453	1446	28.5	II	52.0	49.91	9.9
S-C	1595	1647	1665	1636	36.3	II	57.5	54.94	10.56
S-B	1417	1480	1397	1431	43.3	II	54.8	51.4	7.90
S-A	1515	1558	1549	1540	22.6	II	62.3	60.31	14.85
S-K	1839	1900	1937	1892	49.4	II	53.2	50.4	15.49
F-S	1463	1463	1441	1455	12.7	I	49.9	49.0	2.97
E-H	1515	1566	1519	1533	28.3	II	53.0	51.1	7.19
D-S	1663	1693	1674	1677	15.1	II	57.5	56.5	5.44
C-W	1538	1523	1521	1527	9.3	II	56.9	56.2	2.52
B-S	1589	1580	1591	1587	5.9	II	56.4	56.0	1.57
A-H	1533	1507	1585	1542	39.7	II	51.7	49.1	12.05
KI.	1522	1438	1583	1548	96.9	II	52.3	47.0	19.54
2. 11.	1678	1751	1659	1696	48.5	I	46.0	43.4	7.25
24. 10.	1573	1651	1647	1623	43.9	I	44.1	41.7	9.84
17. 10.	1760	1758	1730	1749	16.7	I	47.98	47.1	3.85
15. 10.	1575	1684	1659	1639	57.0	I	45.94	45.4	4.95
14. 8.	1623	1613	1638	1625	12.6	I	48.99	48.2	2.98
11. 8.	1422	1507	1425	1451	48.2	I	41.41	40.0	6.64
6. 8.	1557	1605	1578	1580	24.0	I	48.90	47.4	4.98
28. 7.	1820	1755	1854	1810	50.3	II	55.75	52.6	9.59
20. 7.	792	769	823	795	27.0	II	52.65	50.0	15.03
19. 7.	812	840	839	830	15.8	II	56.29	54.1	7.67
16. 7.	611	662	656	643	27.8	II	56.26	51.3	14.73
9. 7.	2749*	2700*	2861*	2799*	106.8*	-	58.51	43.88	22.41
16. 4.	3427*	4108*	3599*	3711*	354.1*	-	53.28	46.76	48.18
P-38	1276	1282	1283	1280	3.7	I	35.08	34.87	1.02
P-29	1477	1492	1534	1501	29.5	I	43.04	41.34	7.01
P-21	1409	1373	1369	1383	22.0	I	44.5	43.1	7.41
Rü	1638	1659	1623	1640	18.0	I	46.4	45.4	3.82
He	1430	1463	1439	1444	17.1	I	42.0	41.1	5.29
Ha	1490	1584	1532	1535	47.1	I	42.9	40.21	9.84
Hi	1442	1433	1422	1432	10.0	I	46.7	46.1	2.58

1) = Kollektiv - Zuordnung nach %B_{x̄}

* Meßwerte in dpm ; wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da Radioaktivität weit über dem Sollwert

Kollektiv I : Eichkurven mit $\%B_o$ zwischen 30 und 50

Kollektiv II : Eichkurven mit $\%B_o$ zwischen 51 und 62, 25

Ergebnis:

Die einzelnen ermittelten Sensitivitätsgrenzen sind der Tab. 29 zu entnehmen. Die gemeinsame Analyse aller Eichkurven jedes Kollektivs ergab folgende mittlere Sensitivitätsgrenzen: (Tab. 30)

Tab. 30 : Mittlere Sensitivitätsgrenzen von Eichkurven mit $\%B_o$ über und unter 50

Kollektiv	$\%B_o$	n	mittlere Sensitivitätsgrenze pg/Ansatz	VK %
I	33 - 50	15	$5.36 \pm 2.6(\text{SD}) \pm 0.67(\text{SEM})$	48.6
II	51 - 62, 25	15	$10.24 \pm 5.08(\text{SD}) \pm 1.31(\text{SEM})$	49.6

Die Prüfung der Mittelwertdifferenz im ungepaarten T-Test ergab signifikant höhere Sensitivität der Eichkurven mit $\%B_o$ unter 50 gegenüber denjenigen mit $\%B_o$ über 50. ($p < 0.01$)

Zwei Eichkurven wurden getrennt analysiert, und nicht in die obigen Mittelwertberechnungen einbezogen, da die verwendete Tracermenge weit über dem Sollwert lag. Die Sensitivität war in beiden Fällen mit 22,41 bzw. 48,86 pg/Ansatz deutlich reduziert.

Auswertung:

Die Ergebnisse dieser Sensitivitätsanalyse stehen in gutem Einklang mit den theoretischen Erwartungen!

1. Die Sensitivität von Eichkurven mit $\%B_o$ zwischen 33 und 50 ist signifikant ($p < 0.01$) besser als die von Eichkurven mit höherem $\%B_o$.
2. Erhöhte Tracerkonzentration resultiert in einem Sensitivitätsverlust.

2.1.4.2. Praktische Sensitivitätsprüfung

Versuch:

In je 15 Eppendorf-Gefäße wurde

0,0, 4,44, 4,995, und 5,55pg

Aldosteron in einer äthanolischen Eichlösung pipettiert. Alle Ansätze wurden wie eine übliche Eichkurve gemeinsam in einem RIA analysiert. Ergebnisse: (Tab. 31, Abb. 21)

Für die 15 Einzelmeßwerte jedes Dosispunktes wurden folgende Mittelwerte und SD berechnet.

Tab. 32 : Praktische Sensitivitätsprüfung mit Signifikanztest

n	Dosis(pg)	$\%B_{MW} \pm SD$	Differenz zu $\%B_0$
15	0	$48,04 \pm 3,52$	-
15	4,44	$49,65 \pm 1,35$	nicht signifikant ($0,2 > p > 0,1$)
15	4,995	$47,89 \pm 2,89$	nicht signifikant ($0,9 > p > 0,8$)
15	5,55	$44,48 \pm 2,46$	signifikant ($0,01 > p > 0,001$)

Auswertung:

Alle Ergebnisse jedes Dosispunktes wurden dann mit allen Ergebnissen für die Dosis 0 im ungepaarten T-Test nach STUDENT verglichen und auf signifikante Differenz untersucht. Erst für die Dosis 5,55 pg/Ansatz ließ sich ein signifikanter Unterschied gegenüber der "RIA - Antwort" bei der Dosis 0 nachweisen.

Die praktisch nachweisbare Sensitivitätsgrenze des RIAs (mind. 5,55 pg/Ansatz) für Eichkurven mit $\%B_0 < 50$ stimmt somit recht gut mit der theoretisch berechneten überein.

2.1.5. Wiederfindungsanalyse ("Recovery-Kalulation")

Die Aldosteron-Verluste vom Beginn der Extraktion bis zum Erhalt des PC-Eluates werden auf Grund der Abnahme der Radioaktivität des inneren Standards berechnet.

Bei retrospektiver Analyse von 372 durchgeführten Assays wurde eine mittlere Wiederfindungsrate von

$$39,46 \pm 8,79 \text{ (SD)} \pm 0,462 \text{ (SEM)} \% \quad (\text{VK} = 22,26 \%)$$

errechnet.

p. 31 : Ergebnisse der praktischen Sensitivitätsprüfung

Ansatz (pg)	0.0		4.44		4.995		5.55	
über 100%	108.03	107.88	108.10	105.52	108.87	106.56		
	107.76	106.06	105.40	105.25	105.34	103.93		
	105.57	105.05	104.44	103.85	103.47	103.31		
	104.00	103.41	103.79	103.26	103.12	101.89		
	101.78		103.57	103.51				
			103.01	102.74				
X *			102.71	101.47				
			101.43					
	96.69	92.02	95.23		97.39	95.41	95.91	95.45
	91.85	90.74			95.33	93.92	95.26	94.34
	90.09	89.06			93.37	88.67	94.32	94.21
							93.83	93.54
unter 100%							93.40	94.27
							92.98	92.38
							91.88	90.30
							74.12	

$$X = \frac{\text{Einzelmeßwert} \times 100}{\text{Mittelwert für } 0 \text{ pg}}$$

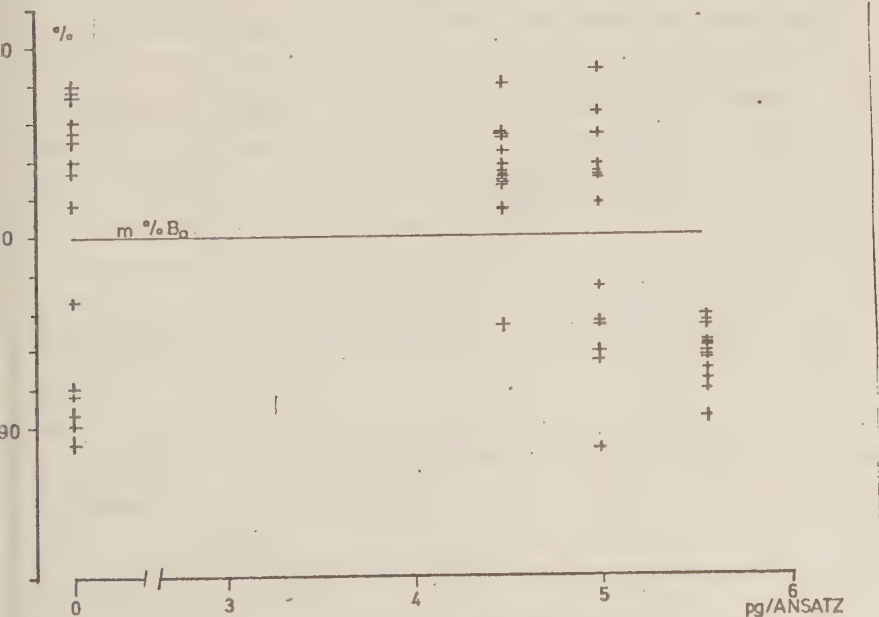


Abb. 25: Praktische Sensitivitätsprüfung durch Analyse von Ansätzen mit definierten Aldosteronzusätzen im Sensitivitätsgrenzbereich

Bei der Kalkulation der Proben auf dem Tischrechner wird die "Recovery (R) pro 0.1 ml" ausgedruckt. Da das Gesamteluat in der letzten Modifikation der Methode 1.4 ml umfasst, beträgt die Gesamtwiederfindung also $14 \times R$. Es empfiehlt sich grundsätzlich eine kritische Beurteilung der Wiederfindung für jede Probe. Ergebnisse, die auf einer Wiederfindung von unter 25% (R kleiner als 1.78%) kalkuliert wurden, sollten unberücksichtigt bleiben, weil die Präzision bei geringen Ausbeuten stark abnimmt. Die Wiederfindungsanalyse ist somit als Parameter der Zuverlässigkeitskontrolle für die einzelne gemessene Probe anzusehen.

2. 2. Plasmaaldosteron – Tagesprofile

Der Aldosteron Plasmaspiegel unterliegt ähnlich dem Cortisol, ACTH (NEY, 1963) und Renin (GORDON, 1966) einem circadianen Rythmus (KEM, 1970), der überlagert wird von unregelmäßigen episodischen Sekretionsperioden (VETTER, 1974).

Es liegt deshalb nahe, zu vermuten, der Aldosteron-Plasmaspiegel könnte mit dem circadianen Rythmus des ACTH, des Renins oder beiden in einer causalen Beziehung stehen.

MICHELAKIS (1970) und WILLIAMS (1972) kamen übereinstimmend zu der Ansicht, daß der Tagesrythmus des Plasmaaldosterons bei Normalpersonen und unter normaler Diät von der Plasmareninaktivität gesteuert wird.

Bei Patienten mit primärem Aldosteronismus wurde ebenfalls ein Aldosteron-Tagesrythmus nachgewiesen. (KEM, 1973) Da das RAA-System in diesen Fällen supprimiert ist, kann es für die Steuerung des Aldosteron-Profiles nicht ausschlaggebend sein. Aus der Beobachtung, daß ACTH-Suppression durch hochdosierte Glucocorticoid-Medikation (Dexamethason) bei Patienten mit Hyperaldosteronismus einen deutlichen Abfall des Aldosterons bewirkt (NEWTON, 1968) und ACTH-Infusion zu einem Aldosteronanstieg führt (NEWTON, 1968 ; SLATON, 1969) wurde die Hypothese abgeleitet, die Kontrolle des Aldosteron-Tagesprofils bei Patienten mit primärem Aldosteronismus erfolge durch ACTH (KEM, 1973).

Die beiden nachfolgend beschriebenen Studien an sechs Normalpersonen und drei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus wurden ausgeführt mit dem Ziel, zusätzliche Ergebnisse zur Bestätigung oder Entkräftung dieser beiden Hypothesen über die Regulation des Plasmaaldosterons zu gewinnen.

Methoden:

Plasmaaldosteron wurde nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methode gemessen.

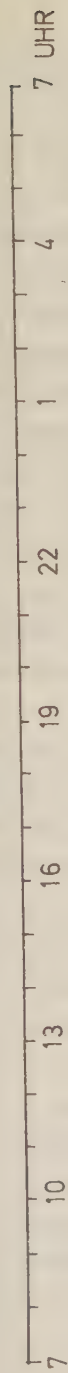
Die Bestimmung des Plasmacortisols wurde nach dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse (MURPHY, 1963, 1967) mittels transcortinreichem Plasma (Plasma einer jungen Frau unter Östrogenmedikation - Kontrazeptiva - wurde durch Ausschütteln mit 50 mg Aktivkohle/ml steroidfrei gemacht und diente in einer Verdünnung 1: 100 mit 1/15 m Phosphat-Puffer pH 7,4 als Transcortinreagens) nach einer in unserem Labor entwickelten Methode (LOMMER et al. unveröffentlicht), 110 µl Plasma wurden mit ^3H -Cortisol versetzt, das gleichzeitig als Verlust-indikator und als Partner der nachfolgenden Verdrängungsanalyse diente, und mit Essigsäureester extrahiert. Nach Inkubation des evaporierten Extraktes mit dem Transcortinreagens (15 min, 45°C) erfolgte die Trennung von B und F mittels dextranbeschichteter Aktivkohle. Bei Wasser-Blanks von 0 ng betrug die Empfindlichkeit 0,5 ng/Ansatz. Sämtliche Cortisol-Analysen wurden in dreifachen Bestimmungen ausgeführt. Die Reninaktivität wurde ebenfalls radioimmunologisch in Form des Angiotensin I bestimmt (SKINNER, 1967).

2. 2. 1. Circadianer Aldosteronrhythmus bei Normalpersonen im Vergleich mit Plasmacortisol- und Plasmareninspiegel

Sechs gesunde, männliche, freiwillige Versuchspersonen im Alter von 20 bis 26 Jahren wurden zur Durchführung der Studie 4 Tage hospitalisiert. Der Ablauf der Untersuchungen und die klinischen Bedingungen sind aus Abb. 26 ersichtlich:

1. Ruhetag: freie Aktivität von 7 - 22 h, keine Medikation
2. Tag: Tagesprofilstudien unter Kontrollbedingungen:
Ganztägige Bettruhe; Blutentnahmen über 24 Std. von 7 bis 7 Uhr je 4 ml in einstündigen Intervallen für Cortisol und Reninbestimmung und je 35 ml in dreistündigen Intervallen für Aldosteron-, Cortisol und Reninbestimmungen.
Volumensubstitution alle drei Stunden 50 ml 14 Tage zuvor abgenommenes Eigenblut und Plasmaexpander im Wechsel.
3. Tag: Ruhetag; ab 7 Uhr alle 6 Stunden 0,5 mg Dexamethason (Fortecortin^R) oral mit 2 Eßl. Phosphalugel^R.
4. Tag: Tagesprofilstudien unter ACTH-Suppression:
Ganztägige Bettruhe; Fortführung der Dexamethasonmedikation in sechsstündigen Intervallen. Blutentnahmen und Volumensubstitution wie am 2. Tag.

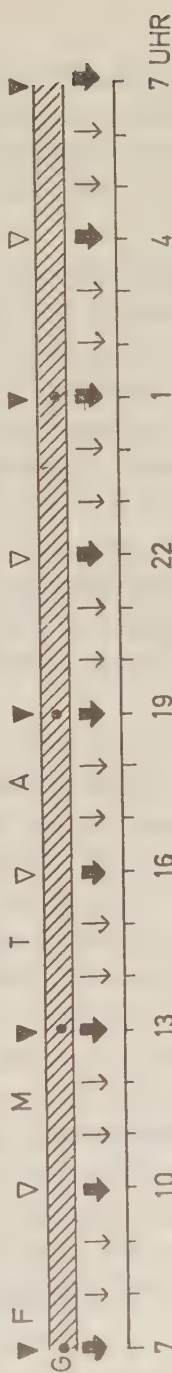
1. TAG



3. TAG



4. TAG



V Plasmaexpander
 F Eigenblut
 M Frühstück
 T Tee
 A Abendessen
 freie Aktivität
 Bettruhe
 große Blutentnahme
 kleine Blutentnahme
 0.5mg Dexamethason p.o.

Abb. 26: Untersuchungsplan für die Aldosteron-Cortisol-Renin-Tagesprofilstudie bei Normalpersonen

Ergebnisse: (Tab. 33 , Abb. 27)

ALDOSTERON

Unter Kontrollbedingungen wurden die höchsten Aldosteronkonzentrationen um vier Uhr morgens gefunden. ($m_{\max}$: $165.55 \pm 51.22(\text{SD})$ pg/ml) Bei den einzelnen Testpersonen lagen die maximalen Aldosteronkonzentrationen in vier von sechs Fällen um 7 Uhr ($259, 202.5, 195, 166$ pg/ml). Der höchste Einzelwert wurde bei Versuchsperson (VP) 6 um 7 Uhr bestimmt (259 pg/ml). Nur in einem Fall (VP 4) wurde das absolute Aldosterontagesmaximum zu atypischer Zeit um 19 h gefunden, (204.0 pg/ml) doch konnte auch bei diesem Patienten ein nahezu gleichhohes Maximum (191.0 pg/ml) um 4 Uhr morgens nachgewiesen werden.

Die geringsten Aldosteronkonzentrationen wurden im Mittel zwischen 16 und 22 Uhr gemessen. ($48.17 \pm 28.56(\text{SD})$ bis $31.17 \pm 11.69(\text{SD})$ pg/ml) Bei individueller Betrachtung ließ sich diese Phase geringer Aldosteronkonzentration bei 5 von 6 VP nachweisen. Bei VP 4 sind lediglich 16 und 22 h - Werte gering, dazwischen liegt um 19 Uhr das oben erwähnte atypische Maximum.

Die mittleren Plasmaaldosteron-Konzentrationen über 24 Std. unter Kontrollbedingungen lagen zwischen 64.87 ± 60.75 (VP 1) und 110.20 ± 59.39 (SD) (VP 4).

Dexamethason erhöhte die mittlere Tageskonzentration des Plasmaaldosterons bei 4 von 6 Testpersonen. In drei von diesen vier Fällen konnte beim integrierenden Vergleich der korrespondierenden Einzelwerte unter Kontrollbedingungen und unter Dexamethason-Medikation im gepaarten T-Test ein signifikanter Anstieg des gesamten Tagesprofils nachgewiesen werden. VP 1: $p < 0.05$, VP 3 : $p < 0.05$ VP 5: $p < 0.025$ ($v = 8$ in allen Fällen). In zwei Fällen erfolgte ein geringer Abfall der mittleren Aldosteronkonzentration unter Dexamethason, der jedoch bei keiner der beiden VP signifikant war. (VP 2: $0.6 < p < 0.7$; VP 6: $0.6 < p < 0.7 - v = 8$) Die maximale Aldosteronkonzentration wurde unter Dexamethason ebenso wie unter Kontrollbedingungen um vier Uhr gemessen ($189.88 \pm 62.89(\text{SD})$) Auch dieser mittlere Maximalwert ist gegenüber dem gleichzeitigen

Maximalwert unter Kontrollbedingungen ($165.55 \pm 51.22(\text{SD})\mu\text{g/ml}$) erhöht. Die individuellen Aldosteron-Tagesmaxima lagen unter Dexamethason in drei Fällen um 7 Uhr, in zwei Fällen um 4 Uhr und in einem Fall um 1 Uhr morgens.

CORTISOL

Maximale Cortisolkonzentrationen unter Kontrollbedingungen wurden in allen Fällen um 7 Uhr ($m_{\text{max}} = 21.50 \pm 3.67(\text{SD})$ und $14.83 \pm 4.31(\text{SD}) \mu\text{g}\%$), minimale Cortisolkonzentrationen zwischen 21 und 2 Uhr nachts – die absolut geringste Plasmakonzentration um 1 Uhr ($1.42 \mu\text{g}\%$) – gemessen. Die Dauer der Phase mit ausgesprochen niedrigem Cortisol variierte bei den einzelnen VP zwischen 2 und etwa 6 Std., die Höhe der Cortisolkonzentration zwischen 0 und $5 \mu\text{g}\%$.

Die verabreichte Menge Dexamethason supprimierte den Cortisolplasmaspiegel in 5 von 6 Fällen unter $1 \mu\text{g}\%$ über die gesamte 24 Std. Periode. In einem Fall wurde nur eine Suppression auf $2.00 \pm 1.64(\text{SD}) \mu\text{g}\%$ erreicht. Die Reduzierung der Cortisolkonzentration unter Dexamethason war in allen 6 Fällen hochsignifikant. ($p < 0.0005$, $\nu = 24$)

RENIN

Die maximale PlasmareninKonzentration wurde sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Dexamethason um 4 Uhr morgens, somit zur gleichen Zeit wie die maximale Aldosteronkonzentration gemessen. (Kontrollbedingungen: $12.75 \pm 3.43(\text{SD})\text{ng/ml/h}$; Dexamethason: $14.17 \pm 3.53(\text{SD}) \text{ng/ml/h}$). Die individuellen Maxima lagen unter Kontrollbedingungen in 4 Fällen um 4 Uhr und je in einem Fall um 6 Uhr bzw. 7 Uhr. Unter Dexamethason wurden individuelle Maxima um 3 Uhr (VP 6), 4 Uhr (VP 3) 5 Uhr (VP 2) und 6 Uhr (VP 1, 4, 5) gefunden. Die mittleren Reninkonzentrationen über 24 Std. unter Dexamethason lagen bei allen 6 Testpersonen höher als unter Kontrollbedingungen. Ein integrierender Vergleich der korrespondierenden Meßwerte im gepaarten T-Test ergab in allen Fällen hochsignifikante Anstiege des Plasmarenins. ($p < 0.0005$ in allen Fällen)

DISKUSSION

Diese Ergebnisse lassen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter ACTH-Suppression durch Dexamethason eine weitgehende Synchronität des Renin - und Aldosteronrhythmus erkennen. Die Koinzidenz

Tab. 33 : Tagesprofilstudien bei Normalpersonen (n = 6)

33a - PLASMAALDOSTERON

Pat.	Ho	St	Wa	Sp	Hi	Sch	m	$\pm$ SD	$\pm$ SEM
Zeit	Aldosteronkonzentration					in pg/ml			
<u>I. Kontrolltag</u>									
7 h	75.3	166.0	125.0	119.8	89.0	259	139.02	66.71	27.23
10 h	83.4	152.5	33.0	51.0	9.0	89	69.65	50.59	20.65
13 h	64.0	97.0	55.0	72.0	24.0	23	55.83	28.69	11.71
16 h	23.0	76.0	36.0	89.0	46.0	19	48.17	28.56	11.66
19 h	11.0	37.0	19.0	204.0	16.0	13	50.0	76.02	31.03
22 h	23.0	31.0	48.0	35.0	36.0	14	31.17	11.69	4.77
1 h	10.0	80.0	32.0	86.0	81.0	55	57.33	30.93	12.63
4 h	91.6	119.7	204.0	191.0	163.0	224	165.55	51.22	20.91
7 h	202.5	135.0	93.0	144.0	195.0	159	154.75	40.59	16.57
m	64.87	99.36	71.67	110.20	73.22	95.00			
SD $\pm$	60.75	48.01	59.96	59.30	66.28	95.86			
SEM $\pm$	20.25	16.00	19.99	19.80	22.09	31.95			
<u>II. unter Dexamethason</u>									
7 h	86.0	89.0	81.0	219.0	201.0	155	138.50	61.92	25.28
10 h	79.9	98.0	73.0	125.0	101.0	135	101.98	24.35	9.94
13 h	135.9	89.0	178.4	163.0	71.0	36	112.22	55.80	22.28
16 h	24.8	86.0	139.2	77.0	64.0	14	67.50	45.32	18.50
19 h	59.7	31.0	87.0	33.0	108.0	109	71.28	35.33	14.42
22 h	48.6	87.0	192.0	57.0	25.0	23	72.10	63.26	25.82
1 h	17.2	129.0	317.0	180.0	84.0	8	122.53	115.64	47.21
4 h	117.3	145.0	203.0	296.0	166.0	212	189.88	62.89	25.67
7 h	195.1	63.0	80.7	382.0	204.0	90	169.13	120.46	49.18
m	84.94	90.78	150.14	170.22	113.78	86.89			
SD $\pm$	56.97	33.24	81.28	114.88	63.0	71.86			
SEM $\pm$	18.99	11.08	27.09	38.29	21.0	23.95			

Integrierender Vergleich im gepaarten T-Test nach STUDENT:

T	-2.304	-0.517	-2.344	-1.650	-2.607	-0.404
$\sqrt{v}$	8	8	8	8	8	8
p	<0.05	>0.6	<0.05	>0.1	<0.025	>0.6
	sign.	n. sign.	sign.	n. sign.	sign.	n. sign.

Tab. 33b - PLASMACORTISOL

Pat. Zeit	Ho	St Cortisolkonzentration	Wa	Sp	Hi	Sch in $\mu\text{g}\%$	m	$\pm\text{SD}$	$\pm\text{SEM}$
I. Kontrolltag									
7 h	22	26	20	25	16	20	21.50	3.67	1.50
8 h	17	20	14	17	10	16	15.67	3.39	1.38
9 h	10	11	8	8	7	7	8.50	1.64	0.67
10 h	6	10	5	8	5	4	6.33	2.25	0.92
11 h	13	15	3	4	4	5	7.33	5.24	2.14
12 h	13	13	7	9	2	3	7.83	4.75	1.94
13 h	10	8	5	6	3	4	6.00	2.61	1.06
14 h	5	10	4	3	2	5	4.83	2.79	1.14
15 h	10	9	4	3	3	5	5.67	3.08	1.26
16 h	-	5	3	2	3	4	3.40	1.14	0.51
17 h	13	10	4	4	1	1	5.50	4.93	2.01
18 h	5	3	7	9	5	9	6.33	2.42	0.99
19 h	10	2	2	5	11	9	6.50	4.04	1.65
20 h	6	6	0	1	12	3	4.67	4.37	1.70
21 h	5	4	0.3	0	3	0	2.05	2.23	0.9
22 h	20	2	0.5	3	2	0.5	4.67	7.57	3.09
23 h	11	2	1	4	0.5	0	3.08	4.13	1.60
24 h	5	3	0.5	3	2	0	2.25	1.84	0.7
1 h	5	0.5	0.5	2	0.5	0	1.42	1.88	0.7
2 h	6	0	1	2	8	4	3.50	3.08	1.21
3 h	4	13	2	3	2	2	4.33	4.32	1.76
4 h	4	13	11	13	0	15	9.33	5.96	2.43
5 h	6	12	15	13	0.5	14	10.08	5.66	2.31
6 h	9	22	14	11	10	10	12.67	4.89	1.99
7 h	9	15	11	20	19	15	14.83	4.31	1.76
m	8.50	9.38	5.71	7.12	5.26	6.22			
SD $\pm$	4.05	6.88	5.52	6.33	5.11	5.80			
SEM $\pm$	0.86	1.38	1.10	1.27	1.02	1.16			

II. unter Dexamethason

7 h	-	0.5	0	0	1	0	0.30	0.45	0.20
8 h	-	0	0	0	0	0	0	0	0
9 h	3	0	0	0	0	0	0.83	2.04	0.83
10 h	5	0	0	0	0	0	0.78	1.59	0.65
11 h	4	0.2	0	0	0.5	0	0.83	2.04	0.83
12 h	5	0	0	0	0	0	0.75	1.60	0.66
13 h	4	0	0	0	0.5	0	1.17	1.60	0.65
14 h	4	1	0	0	2	0	1.00	1.55	0.63
15 h	4	1	0	0	1	0	0.67	0.82	0.33
16 h	2	1	0	0	1	0	0.42	0.49	0.20

Fortsetzung von Tab. 33 b : Plasmacortisol unter Dexamethason

Pat. Zeit	Ho	St	Wa	Sp	Hi	Sch	m	$\pm$ SD	$\pm$ SEM
Cortisolkonzentration in $\mu\text{g}\%$									
17 h	0,5	1	0	0	1	0	0,33	0,41	0,17
18 h	0,5	0,5	0	0	1	0	0,25	0,42	0,17
19 h	0,5	0	0	0	1	0	0,25	0,42	0,17
20 h	0	0,5	0	0	1	0	0,33	0,82	0,33
21 h	0	0	0	0	2	0	0,43	0,79	0,32
22 h	0,5	0,1	0	0	2	0	0,50	0,63	0,26
23 h	1,5	0,5	0	0	1	0	0,58	0,80	0,33
24 h	1	0,5	0	0	2	0	0,33	0,52	0,21
1 h	1	0	0	0	1	0	0,58	0,80	0,33
2 h	2	0,5	0	0	1	0	0,50	0,55	0,22
3 h	1	0	0	1	1	0	0,67	0,82	0,33
4 h	2	0	0	1	1	0	0,83	0,98	0,40
5 h	2	0	0	1	2	0	0,83	0,98	0,40
6 h	1	0	0	1	1	0	0,50	0,55	0,22
7 h	-	0,5	0	1	2	0	0,70	0,84	0,57
m	2,00	0,31	0,00	0,20	1,04	0,00			
SD $\pm$	1,64	0,37	0,00	0,41	0,66	0,00			
SEM $\pm$	0,35	0,07	0,00	0,08	0,13	0,00			

Integrierender Vergleich im gepaarten T-Test nach STUDENT:

T	-7,283	-5,171	-4,067	-6,536	-5,595	-5,360
$\bar{v}$	20	24	24	24	24	24
p	in allen Fällen $< 0,0005$					

Tab. 33 c : - PLASMARENIN

Reninkonzentration in ng/ml/h									
I. Kontrolltag									
7 h	8,56	9,31	5,97	3,80	3,03	4,88	5,93	2,55	1,04
8 h	8,13	10,49	3,39	4,34	3,68	3,52	5,59	2,99	1,22
9 h	8,52	10,51	3,76	5,77	2,80	5,59	6,16	2,90	1,18
10 h	8,71	8,09	5,35	5,10	3,58	7,34	6,36	1,99	0,81
11 h	6,49	9,47	3,98	4,10	3,31	6,09	5,56	2,30	0,94
12 h	3,88	8,32	4,03	5,96	2,88	7,15	5,37	2,12	0,86
13 h	8,29	8,55	5,31	3,63	4,44	4,98	5,87	2,06	0,84
14 h	5,80	7,54	3,89	3,44	3,27	4,30	4,71	1,66	0,68
15 h	8,14	6,26	4,87	3,17	3,63	2,74	4,80	2,08	0,85
16 h	-	6,82	4,21	4,83	4,70	4,60	5,03	1,03	0,46
17 h	3,16	6,62	3,59	3,59	4,16	3,87	4,17	1,25	0,51
18 h	-	7,02	3,91	4,18	4,38	3,44	4,59	1,41	0,63

Fortsetzung von Tab 33c : Plasmarenin unter Kontrollbedingungen

Pat Zeit	Ho	St Reninkonzentration	Wa	Sp	Hi in	Sch ng/ml/h	m	$\pm$ SD	$\pm$ SEM
19 h	5.98	5.97	3.25	3.91	5.42	4.47	4.83	1.14	0.46
20 h	6.42	7.19	3.18	4.14	4.07	3.51	4.75	1.65	0.67
21 h	7.67	5.17	4.44	2.86	3.43	4.94	4.75	1.68	0.69
22 h	4.94	5.03	7.26	1.99	3.05	3.43	4.28	1.86	0.76
23 h	2.74	4.45	5.74	4.34	4.54	6.32	4.69	1.25	0.51
24 h	5.30	5.98	9.58	4.55	5.49	8.83	6.62	2.07	0.84
1 h	3.01	7.63	13.23	10.92	6.96	10.15	8.65	3.58	1.46
2 h	6.47	8.53	12.46	8.66	6.45	9.68	8.71	2.24	0.91
3 h	6.65	8.53	7.98	12.54	8.50	9.11	8.89	1.97	0.81
4 h	15.97	7.93	15.66	11.96	15.34	9.66	12.75	3.43	1.40
5 h	-	7.36	8.97	6.83	14.85	9.68	9.54	3.20	1.43
6 h	13.12	12.18	9.60	9.52	11.09	9.76	10.88	1.52	0.62
7 h	14.05	10.10	8.83	8.69	6.70	11.03	9.90	2.51	1.02
m	6.95	7.87	6.50	5.79	5.67	6.36			
SD $\pm$	2.91	1.98	3.46	2.99	3.51	2.63			
SEM $\pm$	0.65	0.39	0.69	0.61	0.72	0.53			

II. unter Dexamethason

7 h	10.31	13.66	11.87	-	9.85	7.41	10.62	2.33	1.04
8 h	13.04	14.96	11.44	11.03	-	5.67	11.23	3.47	1.55
9 h	21.83	15.26	8.62	6.86	10.47	4.61	11.27	6.31	2.57
10 h	15.24	12.11	8.62	9.46	8.68	6.33	10.07	3.14	1.28
11 h	19.75	15.76	5.99	7.15	8.75	5.42	10.47	5.89	2.41
12 h	21.30	19.71	9.40	6.86	8.59	10.31	12.69	6.18	2.52
13 h	22.79	17.26	13.02	7.03	7.22	10.88	13.03	6.12	2.50
14 h	14.90	12.45	12.87	6.68	8.87	9.17	10.82	3.07	1.25
15 h	11.11	-	14.87	5.95	7.95	7.11	9.40	3.61	1.61
16 h	13.16	14.18	14.09	6.22	10.06	8.61	11.05	3.28	1.34
17 h	11.81	14.46	13.03	5.92	7.08	6.86	9.86	3.67	1.50
18 h	6.71	11.91	9.84	5.95	9.01	12.35	9.30	2.62	1.07
19 h	17.11	8.88	14.58	8.30	11.40	11.72	12.00	3.37	1.37
20 h	14.54	5.79	9.54	4.99	8.54	13.52	9.49	3.91	1.60
21 h	16.37	5.16	9.91	4.80	11.54	8.40	9.36	4.33	1.77
22 h	10.14	4.70	8.54	5.67	3.04	8.67	6.79	2.74	1.12
23 h	8.97	10.03	7.20	6.61	5.28	8.23	7.72	1.71	0.70
24 h	7.86	8.76	5.24	6.34	12.22	12.75	8.86	3.06	1.25
1 h	7.93	7.46	14.31	5.10	15.21	10.70	10.12	4.02	1.64
2 h	10.90	9.74	15.55	4.99	12.09	7.83	10.18	3.62	1.48
3 h	7.57	8.25	14.86	5.31	12.85	15.55	10.73	4.25	1.73
4 h	-	11.81	17.66	9.58	17.47	14.34	14.17	3.53	1.58
5 h	13.11	13.31	10.18	8.75	22.12	14.70	13.70	4.68	1.91
6 h	19.25	4.37	11.96	11.87	23.58	13.06	14.02	6.66	2.72
7 h	18.85	10.62	9.83	11.12	20.32	13.50	14.04	4.49	1.83

Fortsetzung von Tab. 33c: Plasmanenin unter Dexamethason : statist. Auswertung

	Ho	St	Wa	Sp	Hi	Sch
m	14.36	11.28	10.32	7.19	11.34	9.91
SD $\pm$	4.92	4.10	3.15	2.08	5.11	3.19
SEM $\pm$	1.07	0.84	0.63	0.42	0.10	0.64

Integrierender Vergleich im gepaarten T-Test nach STUDENT:

T	7.644	4.162	6.420	2.142	8.923	5.968
ν	20	23	24	23	23	24
p	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.025	<0.0005	<0.0005
	sign.	sign.	sign.	sign.	sign.	sign.

der mittleren Tagesmaxima um 4 Uhr morgens ebenso wie die Übereinstimmung der Phasen geringer Renin- und Aldosteronplasmaspiegel zwischen 16 und 22 h veranschaulichen diese Synchronität eindrucksvoll. Auch bei Betrachtung der individuellen Profile bestätigt sich dieser Befund. Unter Kontrollbedingungen finden sich morgendliche Reninmaxima bei allen Testpersonen 1 bis 3 Std. vor (VP 1, 2, 3, 5) oder etwa gleichzeitig (VP 4, 6) mit Aldosteronmaxima. Unter Dexamethason ist ebenfalls ein Anstieg des Renins meist kurz vor dem Aldosteronanstieg festzustellen.

Die in allen Fällen signifikante Erhöhung des Plasmarenins korreliert in vier Fällen mit einer Erhöhung der mittleren Plasmaaldosteron-Konzentration.

Beide Befunde sprechen für einen kausalen Zusammenhang zwischen Plasmarenin und Plasmaaldosteronspiegel.

Andererseits konnte in keinem Fall eine augenfällige Veränderung des Aldosteronrhythmus unter ACTH-Suppression gegenüber Kontrollbedingungen festgestellt werden. Die zugleich weitgehende Suppression des Plasmacortisols unter Dexamethason macht deutlich, daß eine für normal ACTH-sensibles Nebennierenrindengewebe effektive ACTH-Suppression erfolgte. Darüberhinaus besteht zwischen Cortisolprofil und Aldosteronprofil auch unter Kontrollbedingungen bei keiner Testperson eine deutliche Übereinstimmung. Da die ACTH-Steuerung des Cortisolprofils als gesichert gilt, kann aus diesem und dem vorgenannten Befund geschlossen werden, daß ACTH nicht die entscheidende Rolle bei der Regulation des Aldosteronspiegels von Normalpersonen unter EBD spielt.

Insgesamt liefern die Ergebnisse dieser Studie also zwei Argumente für die Annahme einer Reninsteuerung des Aldosteronspiegels und zwei Argumente gegen die Annahme einer Dominanz der ACTH-Steuerung des Plasmaaldosterons bei Normalpersonen.

Somit sind die vorliegenden Befunde als Bestätigung der ersten eingangs aufgeworfenen Hypothese anzusehen, wonach die Kontrolle des Aldosteronspiegels bei Normalpersonen hauptsächlich durch Renin erfolgt.

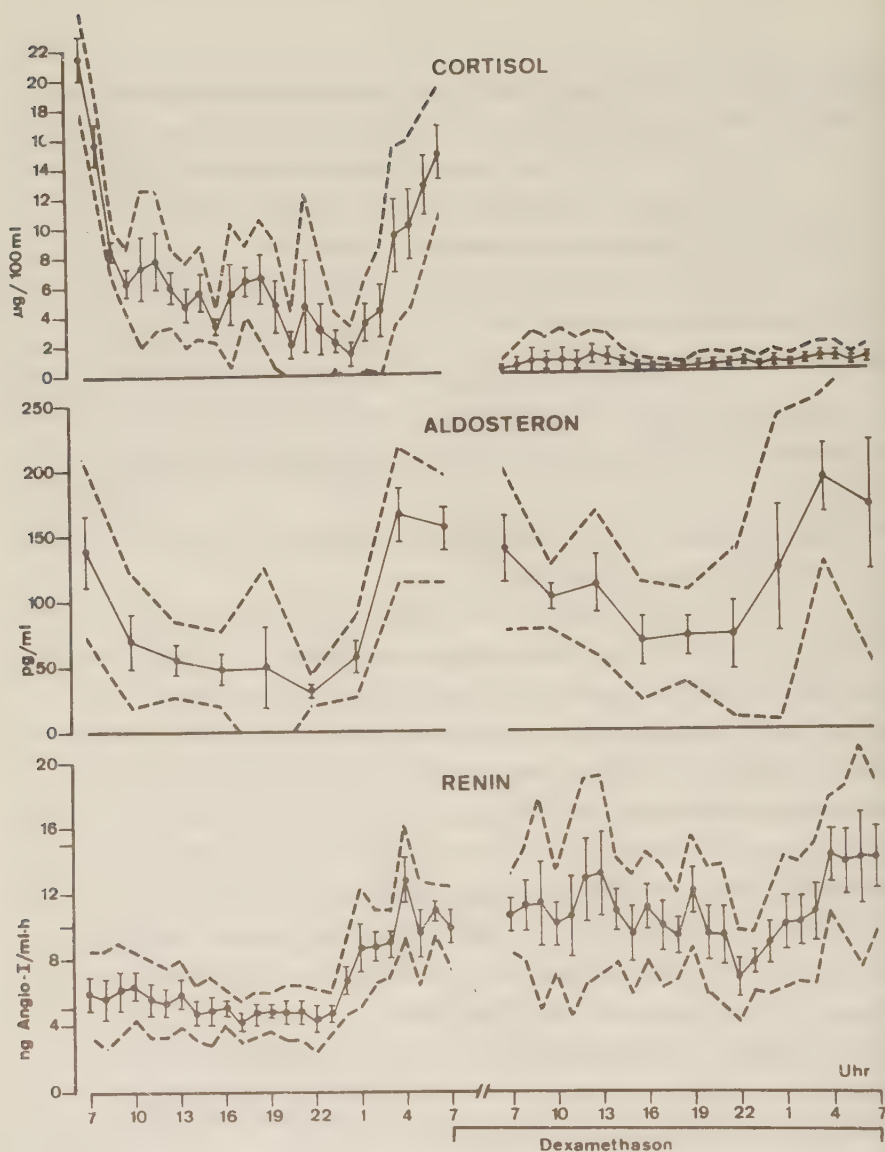


Abb. 27: Circadianer Rythmus von Plasma-Aldosteron, -Cortisol und -Renin bei 6 Normalpersonen unter Kontrollbedingungen und bei ACTH-Suppression durch Dexamethason ($m \pm SD$)

2. 2. 2. Aldosteron- Cortisol und Renin-Nachtrythmus bei drei Patienten mit primärem Aldosteronismus davon einer mit chirurgisch verifiziertem Conn-Syndrom (Adenom)

Bei drei Patienten mit primärem Aldosteronismus wurden Nachtprofile von Plasmaaldosteron, Plasmacortisol und Plasmarenin unter Kontrollbedingungen und Dexamethasonbehandlung gemessen. Dabei wurden die gleichen klinischen Bedingungen wie bei der zuvor beschriebenen Studie an Normalpersonen eingehalten: Bettruhe, Normal-Na-Diät, 0,5 mg Fortecortin in 6 stündigen Intervallen bereits einen Tag vor der 2. Blutentnahmeserie.

Die Blutentnahmen erfolgten zwischen 20(bzw. 22) und 7 Uhr, zunächst in zweistündigen Intervallen, ab zwei Uhr in einstündigen Intervallen und zusätzlich um 4³⁰ Uhr und 5³⁰ Uhr. Die Konzentration der Blutentnahmen auf die Morgenstunden erfolgte auf Grund der Resultate der Studie an Normalpersonen, bei denen in diesem Zeitraum die ausgeprägtesten Aldosteronsekretionsgipfel nachgewiesen wurden.

Ergebnisse: (Tab. 34, Abb. 28)

Unter Kontrollbedingungen war die mittlere Aldosteronkonzentration von 20 bis 7 Uhr bei den drei Patienten deutlich aber in unterschiedlichem Ausmaß erhöht:

Pat. M. K.-H.	männl.	45 Jahre	Conn-Syndrom	1577 ± 610 pg/ml
Pat. S. H.	weibl.	47 Jahre	pA (Conn wahrsch.)	191 ± 124 pg/ml
Pat. S. L.	weibl.	36 Jahre	pA (Conn wahrsch.)	210 ± 94 pg/ml

Die Cortisolkonzentrationen lagen bei allen drei Patienten insgesamt im Normbereich. Bei den drei Patienten fällt im Gegensatz zu dem zuvor für Normalpersonen geschilderten Cortisolprofil eine deutliche Übereinstimmung zwischen Cortisolrythmus und Aldosteronrythmus auf.

Bei M. K. H. treffen von 4 Aldosteronmaxima drei mit gleichzeitigen Cortisolmaxima zusammen; Im vierten Fall entspricht dem Aldosteronmaximum zumindest ein Cortisolanstieg. Bei Pat. S. H. konnte ebenfalls absolute Synchronität von Aldosteron- und Cortisolmaxima (2 und 5 Uhr) nachge-

wiesen werden. Entsprechende Koinzidenz der maximalen Plasmakonzentrationen von Cortisol und Aldosteron findet sich auch bei der Pat. S.L., doch weist dieses Aldosteronprofil nur ein einziges Maximum um 6 h auf (386 pg/ml).

Die absoluten Aldosteronmaxima liegen um 5 Uhr (S.H.: 529 pg/ml) und um 6 Uhr (M.K.H.: 2484 pg/ml; S.L.: 209,9 pg/ml). Die geringsten Aldosteronkonzentrationen finden sich um 22 Uhr (M.K.H.: 406 pg/ml) bzw. 24 Uhr (S.H.: 63 pg/ml; S.L.: 92 pg/ml).

Das P₁ asmarenin war bei allen drei Patienten deutlich unter den Normalbereich supprimiert.

Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, daß die Reninsuppression bei M.K.H. trotz des stärker ausgeprägten Hyperaldosteronismus geringer ist ($m = 1.95 \pm 0.62$ (SD) ng/ml/h) als bei S.H. ($m = 0.63 \pm 0.29$ (SD) ng/ml/h) mit nur mäßigem Hyperaldosteronismus. Bei M.K.H. ist die Reninkonzentration in den frühen Morgenstunden (4–7 Uhr) synchron mit dem Aldosteronanstieg unter 2 ng/ml/h supprimiert, während sie von 22 bis 3 Uhr etwas höher zwischen 2.4 und 3.0 ng/ml/h liegt. Bei S.H. ist die Reninsuppression insgesamt ausgeprägter, so daß sich auch eine entsprechende negativ gekoppelte Synchronität zwischen Aldosteron und Reninprofil, die bei M.K.H. eventuell zu vermuten ist, nicht nachweisen läßt.

Unter Dexamethasonsuppression wurde die Cortisolkonzentration bei allen Patienten im Mittel unter ein $\mu\text{g}\%$ supprimiert. Bei S.H. konnte in keinem Fall eine von 0 unterscheidbare Cortisolkonzentration gemessen werden, dagegen wurden bei M.K.H. insbesondere in den frühen Morgenstunden leichte Cortisolanstiege festgestellt ($m = 0.91 \pm 1.38$ (SD) ng/ml/h), das Cortisolprofil der Patientin S.L. zeigte demgegenüber genau umgekehrtes Verhalten: vollkommene Cortisolsuppression von 3 bis 6 Uhr und geringe Cortisolspiegel von 20 bis 2 Uhr. ($m = 0.96 \pm 1.33$ (SD) ng/ml/h)

Die Cortisolsuppression gegenüber Kontrollbedingungen war in allen drei Fällen signifikant. (M.K.H.: $p < 0.001$; S.H.: $p < 0.005$; S.L.: $p < 0.01$) Die mittlere Plasmaaldosteronkonzentration sinkt bei allen Pat. unter

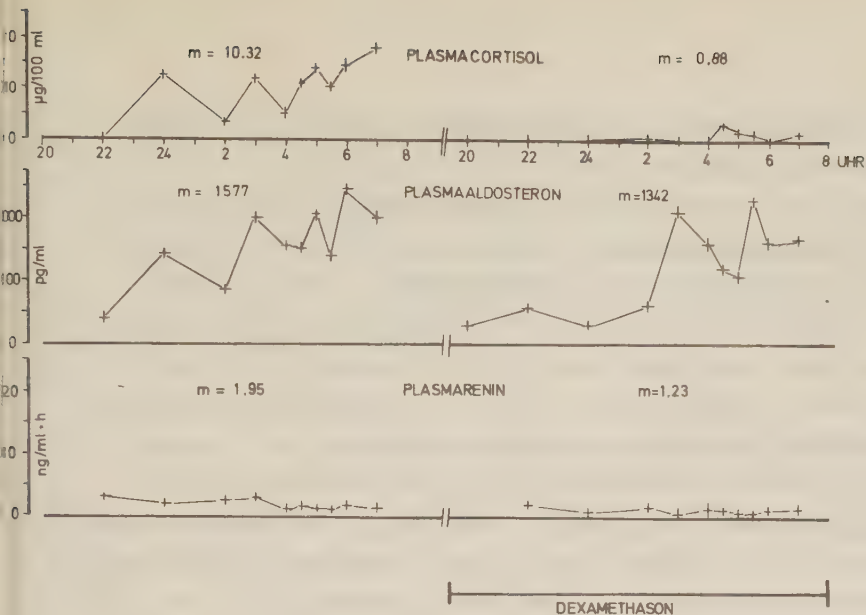


Abb. 28a: Aldosteron, Cortisol und Renin - Nachtrythmus bei einem Pat. (M. K.-H.) mit Conn-Syndrom unter Kontrollbedingungen und bei ACTH-Suppression durch Dexamethason

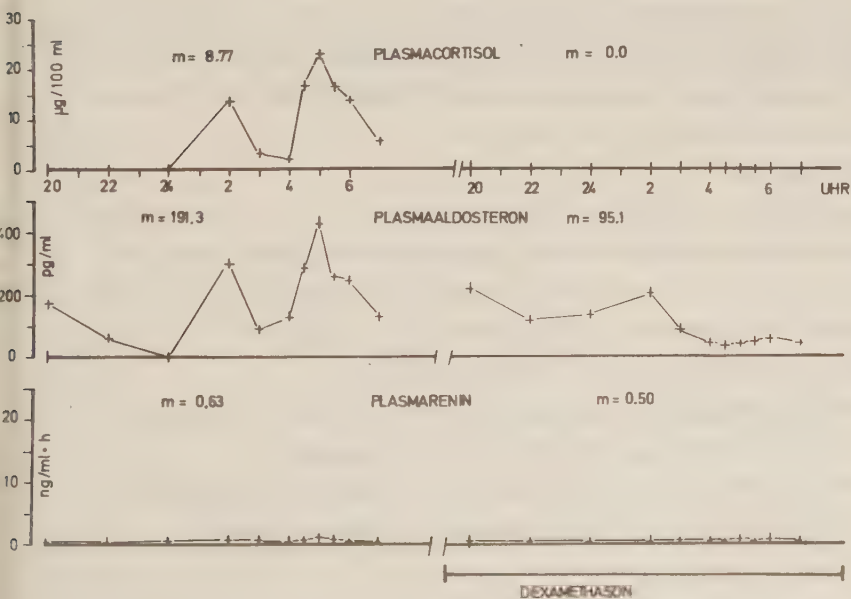


Abb. 28b: Aldosteron, Cortisol und Renin-Nachtrythmus bei einer Patientin mit primärem Hyperaldosteronismus (Conn?) (S. H.) unter Kontrollbedingungen und bei ACTH-Suppression mit Dexamethason

Dexamethason ab(M, K-H.: 1342 ± 673 (SD); S. H.: 95.1 ± 66.2 (SD); S. L.: 34.7 ± 26.2 (SD) pg/ml),

Beim Vergleich miteinander korrespondierender Werte unter Kontroll- und Suppressionsbedingungen im gepaarten T-Test ist die Aldosteron-suppression bei S. H. und S. L. signifikant (S. H.: $p < 0.05$, $v = 9$; S. L.: $p < 0.0005$, $v = 10$). Der Abfall der mittleren Aldosteronkonzentration bei M, K-H. unter Dexamethason ist nicht signifikant ($p > 0.3$). Der Aldosteronrhythmus ist bei S. H. und S. L. unter Dexamethason praktisch aufgehoben, bei M, K-H. ist er deutlich verändert.

Auch die mittleren Reninkonzentrationen unter Dexamethason (M, K-H.: 1.23 ± 0.47 (SD); S. H.: 0.50 ± 0.16 (SD); S. L.: 1.93 ± 0.45 (SD) ng/ml/h) waren bei allen Patienten mit pA erniedrigt gegenüber Kontrollbedingungen. Die Reninsuppression war in zwei Fällen signifikant (M, K-H.: $p < 0.05$; S. L.: $p < 0.0025$).

Die mittleren Plasmakaliumkonzentrationen waren in unterschiedlichem Ausmaß erniedrigt (M, K-H.: 2.46 ± 0.05 (SD); S. H.: 2.89 ± 0.12 (SD); S. L.: 3.51 ± 0.116 (SD) mval jeweils unter Kontrollbedingungen), stiegen aber bei allen Patienten unter Dexamethason signifikant an. (M, K-H.: 2.56 ± 0.08 (SD), $p < 0.05$; S. H.: 3.21 ± 0.16 (SD), $p < 0.01$; S. L.: 3.83 ± 0.128 (SD) $p < 0.005$). Es wurden jedoch in keinem Falle normale Plasmakaliumkonzentrationen erreicht.

DISKUSSION:

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß der Plasmaaldosteronspiegel bei Patienten mit Hyperaldosteronismus primär einer ACTH-Steuerung unterliegt, während Renin im Gegensatz zu Normalpersonen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Mehrere Befunde legen diese Interpretation nahe:

1. Die auffallende Synchronität zwischen Cortisol- und Aldosteronprofil unter Kontrollbedingungen bei allen drei Patienten.
2. Bei allen Patienten erfolgte unter ACTH-Suppression ein Abfall der mittleren Aldosteronkonzentration und ein Kalium-Anstieg.

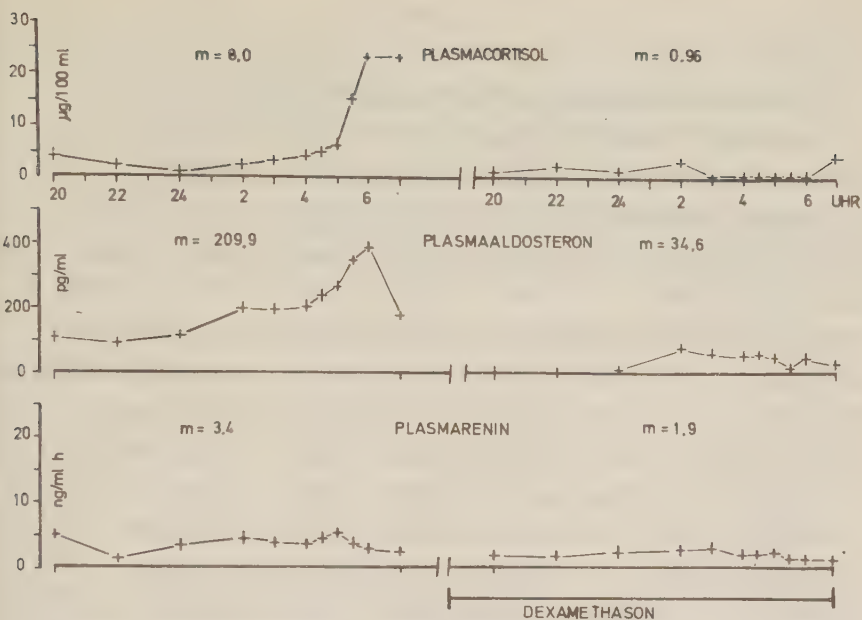


Abb. 28c: Aldosteron-, Cortisol- und Renin-Nachtrythmus bei einer Patientin mit primärem Hyperaldosteronismus (Conn?) (S. L.) unter Kontrollbedingungen und bei ACTH-Suppression durch Dexamethason

Der Aldosteronabfall war bei zwei von drei Patienten, der Kalium-Anstieg bei allen Patienten signifikant.

3. Der Aldosteronrhythmus wurde in zwei Fällen durch Dexamethason praktisch aufgehoben, im dritten Fall weitgehend verändert.

Alle drei Befunde stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Normalpersonen.

Obwohl die fehlende Signifikanz der Aldosteronsuppression unter Dexamethason bei M. K.-H. auf den ersten Blick gegen eine Gleichbeurteilung der drei Fälle zu sprechen scheint, lassen zwei Befunde dies dennoch gerechtfertigt erscheinen. Zum einen ist bei M. K.-H. im Gegensatz zu S. H. keine vollständige Suppression des Cortisolprofils durch die verabreichte Menge Dexamethason erreicht worden, die ACTH-Stimulation mithin nicht in allen Phasen vollständig aufgehoben worden.

Die beiden unter Dexamethason verbliebenen Aldosteronmaxima (3 und 5³⁰ h) treten jeweils mit einer Stunde Verzögerung nach den Cortisolmaxima um 2 und 4³⁰ h auf und könnten somit vielleicht als ACTH-stimulationsbedingt angesehen werden. Der im Vergleich zu den beiden anderen pA-Patienten geringe Aldosteronabfall ließe sich somit auf eine unzureichende ACTH-Suppression zurückführen. Umgekehrt steht zu vermuten, daß auch bei M. K.-H. der Aldosteronrhythmus durch Applikation einer ausreichenden Menge Dexamethason vollständig eliminiert worden wäre.

Der mögliche Einwand, daß bei Normalpersonen gleich minimale Cortisolkonzentrationen auftraten, ohne daß man auf eine ineffektive ACTH-Suppression habe schließen können, muß entgegnet werden, daß, wie bei den Pat. S. H. und S. L. nachgewiesen, NNR-Gewebe von Pat. mit pA (Aldosteronorgewebe) offensichtlich eine gegenüber Normalgewebe erhöhte ACTH-Sensibilität besitzt. Diese könnte dafür verantwortlich sein, daß auch geringe ACTH-Stimulation bei M. K.-H. noch einen Aldosteronrhythmus zu induzieren vermochte.

Das unter Dexamethason verbleibende Aldosteronprofil, wie es sich bei S. H. und S. L. darstellt (Abb. 28 a/b) ist somit als Folge der autonomen Aldosteronproduktion der Tumorzellen zu interpretieren.

Tab. 34 : Nachrhythmus von Plasmaaldosteron, Plasmacortisol, Plasmarenin, Na^+ und K^+ -Spiegel unter Kontrollbedingungen und bei ACTH-Suppression durch Dexamethason bei drei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus (davon ein chirurgisch nachgewiesenes Conn-Syndrom)

M. K.-H. 45 J männl. (Conn-Sy.)					S. H. 47 J weibl. pA(Conn ?)					
Zeit	Aldo pg/ml	Cortisol µg%	Renin ng/ml/h	Na ⁺ mval	K ⁺ mval	Aldo pg/ml	Cortisol µg%	Renin ng/ml/h	Na ⁺ mval	K ⁺ mval
<u>1. Kontrollnacht</u>										
20 h	-	-	-	-	-	174	0.0	0.38	149	2.8
22 h	406	0.3	3.0	144	2.49	63	0.0	0.20	149	3.0
24 h	1421	12.9	1.9	144	2.46	0.0	0.0	0.52	140	2.8
2 h	875	3.5	2.4	144	2.46	300	14.0	0.87	140	2.8
3 h	2010	12.2	2.4	144	2.41	91	3.5	0.92	143	2.9
4 h	1582	5.3	1.3	145	2.36	130	2.0	0.69	-	-
4 ³⁰ h	1527	11.1	1.8	145	2.43	287	17	0.88	149	2.8
5 h	2056	13.65	1.4	144	2.50	429	23.5	1.03	144	2.9
5 ³⁰ h	1399	11.7	1.3	144	2.47	258	16.5	0.77	144	2.8
6 h	2484	14.35	1.9	144	2.53	243	14.0	0.54	149	3.2
7 h	2010	18.2	1.6	146	2.51	130	6.0	0.15	139	2.9
m	1577	10.32	1.95	144.4	2.46	191.3	8.77	0.63	144.1	2.8
SD ±	610	5.52	0.62	0.69	0.05	124.7	8.43	0.29	4.07	0.1
SEM ±	193	1.74	0.197	0.22	0.02	37.6	2.54	0.09	1.35	0.0
VK(%)	38.6	53.4	32.0	0.48	2.06	65.1	96.1	47.0	2.82	4.4
<u>2. unter Dexamethason</u>										
20 h	334	0.5	2.1	143	2.75	220	0.0	0.56	138	3.1
22 h	623	0.3	0.6	144	2.51	115	0.0	0.40	140	3.1
24 h	325	0.0	1.69	144	2.52	132	0.0	0.27	147	3.3
2 h	645	0.9	2.0	144	2.55	207	0.0	0.32	141	3.2
3 h	2154	0.0	0.8	144	2.48	87	0.0	0.71	147	3.2
4 h	1641	0.0	1.5	144	2.64	49	0.0	0.47	139	3.1
4 ³⁰ h	1233	4.5	1.3	145	2.52	33	0.0	0.46	136	3.0
5 h	1115	1.68	0.7	144	2.55	47	0.0	0.71	142	3.4
5 ³⁰ h	2348	0.8	0.9	144	2.60	50	0.0	0.60	138	3.2
6 h	1643	0.0	1.3	144	2.52	59	0.0	0.7	139	3.2
7 h	1702	1.0	1.6	144	2.76	47	0.0	0.37	142	3.6
m *	1342	0.91	1.23	144.1	2.56	95.1	0.0	0.50	140.8	3.2
SD ±	673	1.38	0.47	0.31	0.08	66.2	0.0	0.16	3.54	0.16
SEM ±	212	4.30	0.15	0.1	0.03	19.9	0.0	0.05	1.06	0.05
VK(%)	50.1	150.5	37.9	0.22	3.22	69.6	0.0	31.6	2.51	5.16
T	0.6106	5.393	2.621		3.46	2.1038	3.4501	0.984		5.205
√	9	9	9		9	10	10	10		9
p	> 0.2	< 0.001	< 0.05		< 0.005	< 0.05	< 0.005	> 0.1		< 0.001

Tab. 34 : Fortsetzung

S. L. 36 J weibl. pA(Conn-Syndrom?)					
Zeit	Aldo pg/ml	Cortisol µg%	Renin ng/ml/h	Na ⁺ mval	K ⁺
1. Kontrollnacht					
20 h	108	4.0	2.51	142	3.7
22 h	92	2.0	1.33	143	3.5
24 h	111	1.0	3.32	142	3.5
2 h	198	2.0	4.11	142	3.7
3 h	191	3.0	3.93	141	3.5
4 h	202	4.0	3.65	141	3.5
4 ³⁰ h	233	5.0	4.49	141	3.5
5 h	267	6.0	5.15	140	3.3
5 ³⁰ h	344	15.0	3.49	143	3.6
6 h	386	23.0	3.71	140	3.5
7 h	177	23.0	2.36	142	3.4
m	209.9	8.0	3.36	141.5	3.51
SD ±	94.0	8.3	1.08	1.08	0.116
SEM ±	28.3	2.5	0.32	0.34	0.035
VK(%)	44.8	103.8	32.1	0.76	3.31
2. unter Dexamethason					
20 h	0	1.0	1.89	140	3.9
22 h	0	2.0	1.84	138	3.9
24 h	9.4	1.0	2.29	138	3.9
2 h	78	3.0	2.61	137	4.0
3 h	55	0.0	2.69	139	4.0
4 h	50	0.0	1.81	138	3.8
4 ³⁰ h	56	0.0	1.80	139	3.8
5 h	47	0.0	2.11	139	3.9
5 ³⁰ h	13	0.0	1.53	139	3.7
6 h	47	0.0	1.31	139	3.7
7 h	26	0.6	1.39	137	3.6
m	34.67	0.96	1.93	138.4	3.83
SD ±	26.21	1.33	0.455	0.93	0.128
SEM ±	7.90	0.40	0.137	0.28	0.038
VK(%)	75.59	138	23.57	0.67	3.35
T	5.951	2.826	4.047		7.17
√	10	10	10		10
p	< 0.005 sign.	< 0.01 sign.	< 0.0025 sign.		< 0.0005 sign.

Renin spielt bei Hyperaldosteronismus-Patienten offensichtlich keine Rolle für die Aldosteronsekretion. In keinem Fall konnte eine positive Synchronizität zwischen Renin- und Aldosteronspiegel, wie sie bei Normalpersonen nachgewiesen wurde, gefunden werden. Es bleibt die Frage, warum die Reninsuppression bei M. K-H. trotz des ausgeprägten Hyperaldosteronismus geringer war als bei S. H. und S. L. . Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Annahme einer verringerten Empfindlichkeit des RAA-Regelkreises auf die Rückkopplungswirkung durch das Übermaß an Aldosteron.

2.3. Plasmaaldosteron in Ruhe und nach drei Stunden Orthostase

Bei Normalpersonen steigt die Plasmaaldosteron-Konzentration in aufrechter Position signifikant gegenüber der liegenden Position an. (KATZ, 1972)

Diagnostische Bedeutung erlangte diese Tatsache durch die von GANGULY & LUETSCHER (1973) aufgestellte und inzwischen von BIGLIERI (1974) bestätigte Hypothese, daß Patienten mit adenombedingtem Hyperaldosteronismus (APA) einen atypischen Abfall des Plasmaaldosterons auf Orthostasereiz zeigen, wohingegen Patienten mit IAH nach dem Austehen mit einem Plasmaaldosteron-Anstieg reagieren.

2.3.1. Ruhe und Orthostasewerte bei Normalpersonen und bei Patienten ohne Hyperaldosteronismus

Studien an 10 freiwilligen gesunden Normalpersonen unter Normal-Na⁺-Diät ergaben die in der nachfolgenden Tab. 35 wiedergegebenen Normalwerte.

Zwischen den stationär gemessenen Ruhewerten untereinander ($m = 85.37 \pm 57.19$ (SD); $m = 72.08 \pm 44.47$ (SD); $m = 76.16 \pm 47.68$ (SD) pg/ml) sowie zwischen den ambulanten Ruhewerten ($m = 53.42 \pm 37.65$ (SD) pg/ml) und den verschiedenen stationären Ruhewerten läßt sich im gepaarten T-Test nach STUDENT kein signifikanter Unterschied nachweisen.

Tab. 35 : Normalwerte in Ruhe und Orthostase unter EBD

äußere Bedingungen	n	MW	$\pm$ SD	$\pm$ SEM	VK	T
Versuchsp.						
R _{amb.} : ambulant nach 1/2 Std. Ruhe	7	53.42	37.65	14.23	70.47	3.754
Versuchsp.						
R _I : stationär nach mind. 8 Std. Ruhe	9	85.37	57.19	19.06	66.99	4.477
Versuchsp.						
R _{II} : stationär nach 8 Std. Ruhe	10	72.08	44.47	14.06	61.70	5.1245
Versuchsp.						
O : stationär nach 3 Std. Orthostase	10	230.14	102.52	32.42	44.54	7.0985
Versuchsp.						
R _{III} : stationär nach wiederum 1/2 Std. Ruhe	8	76.16	47.68	16.85	62.61	4.5175

Statistische Vergleiche im ungepaarten T-Test:

$$R_{amb.} : R_I : p < 0.1 \quad v = 6$$

$$R_I : R_{II} : p < 0.1 \quad v = 7$$

$$R_{III} : R_{II} : p < 0.2 \quad v = 6$$

Dagegen ist der Anstieg von den Ruhewerten R_I zu den Orthostasewerten ebenso hochsignifikant ($p < 0.001$, $v=8$) wie der Abfall des 3. Ruhewertes nach der Orthostase ($p < 0.001$).

Die Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß die bei ambulanten Patienten unter eindeutig eingehaltenen Ruhebedingungen gewonnenen Resultate ähnlich aussagekräftig sind wie stationär erhobene Plasmaaldosteronbefunde. Diese Feststellung ist für die praktische Durchführung von Aldosteron-Screening-Untersuchungen bei Hochdruckpatienten von Bedeutung.

Tab. 36 : Ruhe- und Orthostasewerte des Plasmaaldosterons unter verschiedenen Diätbedingungen

Diät Pat.	Geschl.	Alter J	ad lib.		NaCl-Belastung		EBD	
			R	O	R	O	R	O
			pg/ml		pg/ml		pg/ml	
G. K.	m	23	41.7	-				
S. H.	w	41	79.8	-				
B. I.	w	54	56.7	-				
H. E.	w.	27	105.2	780.5				
P. I.	w	32	39.5	-				
R. K.	m	19	99.7	139.9				
P. I.	w	32	78.8	602.2				
C. A.	w	32	108.4	-				
W. M.	w	53	27.6	193				
S. M.	w	39	10	218				
W. H.	m	40	56	202				
P. K.	w	32	47	242				
H. E.	w	37	56	299				
B. K.	m	42	34	-				
R. G.	w	32	51	462				
A. C.	m	41	119	254				
P. K.	m	49	43	92				
L. K.	m	17	42	-				
K. T.	m	52	77	91				
C. A.	w	54	82.3	-				
W. K.	m	20	-	-	16.2	136.9	52.8	331.9
G. G.	m	34	67.8	-				
K. R.	m	23	-	-	46.1	95.8	37.5	194.2
G. E.	m	51	-	-	-	-	31.1	176.97
K. H.	m	57	80.3	-				
S. E.	m	22	40.5	-				
S. K.	m	45	-	-	31.0	42.2	39.4	128.3
Z. E.	m	43	63.0	119.5				
B. H.	m	50	103	166				
H. G.	m	38	-	-	21	137	427	550
B. G.	m	30					37	66
S. H.	m	34	80	200				
R. J.	m	33	61	216				
S. G.	m	31			24	62	40	165
H. H.	w	34	80	701	94	181		
F. W.	m	38	112	338				
L. M.	m	22	-	-	22	33	33	282
S. M.	m	37	58.5	125.3				
L. W.	m	18	24	126				
M. E.	w	49	75	548				
S. I.	w	34	-	-	23	55.6	36.2	114.9
S. W.	m	38	30	94.6				
W. I.	w	30	-	-	32	131	51	250
G. L.	w	46	-	-	22	134	71.5	209.3
L. I.	w	35	-	-	-	-	32	82

Tab. 36 : Statistische Auswertung

Diät	ad lib.		NaCl-Belastung		EBD	
	R	O	R	O	R	O
m	64.53	282.2	33.1	100.8	42.2	172.8
SD $\pm$	27.85	104.9	22.9	50.1	11.5	85.1
SEM $\pm$	4.8	43.6	7.21	15.8	3.3	24.5
VK(%)	43.15	72.5	69.3	49.7	27.3	49.2
n	33	22	10	10	12	12
m : w	19:14	13:9	6:4	6:4	8:4	8:4

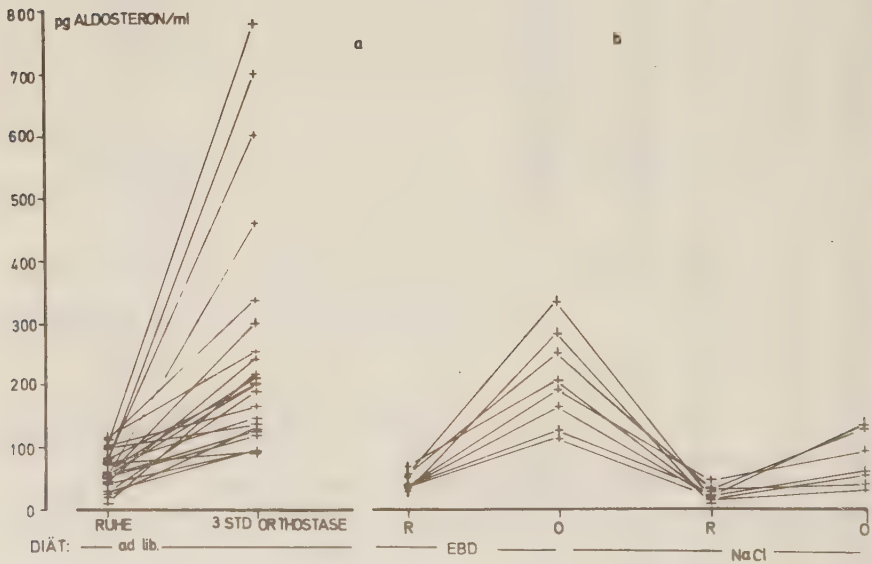


Abb. 29a/b: Ruhe- und Orthostaseplasmaaldosteron bei Patienten unter ad lib. Diät, unter NaCl-Belastung und unter Elektrolyt-Bilanz-Diät

Bei Patienten ohne Hyperaldosteronismus wurde der Plasmaaldosteronspiegel unter Ruhebedingungen (8 Uhr) und nach 3 Std. Umhergehen in der Ebene gemessen (ad lib. Diät). Als mittlere Aldosteronkonzentration wurden $64.53 \pm 27.85(\text{SD})\text{pg/ml}$ unter Ruhebedingungen ($n = 33$, 19 männl. 14 weibl.) und $282.2 \pm 204.9(\text{SD})\text{pg/ml}$ nach 3 Std. Orthostase ($n = 22$, 13 männl. 9 weibl.) bestimmt. Bei 22 Patienten, bei denen Ruhe- und Orthostasewerte nacheinander bestimmt wurden, konnte ein hochsignifikanter Anstieg ($p < 0.001$) des Plasmaaldosterons nachgewiesen werden. (Tab. 36, Abb. 29)

Bei 12 Patienten unter EBD (120 mval Na^+ , $60 - 80\text{ mval K}^+$ /die) ließ sich gleichermaßen ein signifikanter Anstieg des Plasmaaldosterons in Orthostase ($m = 172.8 \pm 85.1(\text{SD})\text{pg/ml}$) gegenüber der Ruhelage ($m = 42.2 \pm 11.5(\text{SD})\text{pg/ml}$) nachweisen. ($p < 0.001$)

Bei 10 dieser Patienten wurde außerdem die Ruhe- und Orthostasekonzentration unter NaCl-Belastung (3 Tage à 10 g NaCl oral) gemessen. Während die Suppression der Ruhewerte unter NaCl-Belastung ($m = 33.1 \pm 22.9(\text{SD})\text{pg/ml}$) im gepaarten T-Test nicht signifikant war ($p > 0.1$), unterschieden sich aber die Orthostasewerte ($m = 100.8 \pm 50.1(\text{SD})\text{pg/ml}$) signifikant von den Ruhewerten ($p < 0.01$).

Der Anstieg des Plasmaaldosterons nach 3 Std. Orthostase war auch unter NaCl-Belastung signifikant. ($p < 0.001$)

Der spezifische Anstieg des Plasmaaldosterons beim Übergang in die aufrechte Körperlage konnte also unter verschiedenen diätetischen Bedingungen bei ambulanten und bei stationären Patienten sowie Normalpersonen nachgewiesen werden. Die wichtige Rolle der Körperlage für die Regulation des Aldosteronspiegels wird durch diese Resultate nachdrücklich bestätigt.

2. 3. 2. Plasmaaldosteron in Ruhe und Orthostase bei einer Patientin mit primärem Hyperaldosteronismus (Conn Syndrom?)

Bisher liegen uns erst zwei Ergebnisse vergleichender Ruhe-Orthostase-Bestimmungen von einer Patientin mit pA vor. Die Pat. S. L. zeigte bei

zwei wiederholt durchgeführten Untersuchungen jedesmal einen deutlichen Abfall des primär erhöhten Ruhealdosterons nach 3 Std. Orthostase. (R_I 370.0, O_I 225 ; R_{II} 471 , O_{II} 389 pg/ml) (Abb. 30)
 Nach der Hypothese von Biglieri müßte es sich also um ein Conn-Syndrom handeln. Die Verifizierung der Diagnose steht derzeit noch aus.

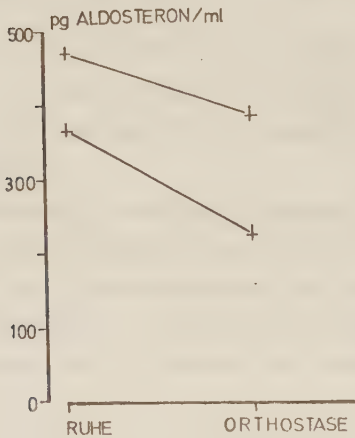


Abb. 30: Atypische Orthostasereaktion des Plasmaaldosterons bei einer Patientin mit primärem Hyperaldosteronismus (vermutlich auf Grund eines Adenoms!)

3. MATERIALIEN, METHODEN und ENDGÜLTIGE MODIFIKATION

der GESAMTMETHODE

3.1. Materialien

3.1.1. Reagentien

1. Gammaglobulin(0,06 %)-Borat(0,1m)-Puffer pH 8

Puffer: 554 ml Lösung A + 446 ml Lösung B

Lösung A: 12,37 g H_3BO_3 (Merck No. 165) in 1 000 ml Meßkolben mit ca 500 ml aqua bidest. lösen. Dazu exakt 100 ml 1 n NaOH (Titrisol, Merck No. 9956). Mit aqua bidest. ad 1 000 ml auffüllen.

Lösung B: 0,1 n HCl (Titrisol, Merck No. 9973)

Gammaglobulin-Puffer: 1 Amp. (= 5 ml = 800 mg) Gammaglobulin (Beriglobin) in 1300 ml Puffer aufnehmen ($\approx$ 0,062 %)

pH des fertigen Puffers im pH-Meter überprüfen und gegebenenfalls korrigieren.

2. Antiserum-Verdünnung

Stammverdünnung: (1 : 1000) Bei Bedarf wird eine Portion der Stammverdünnung aufgetaut (je nach Titer 200 – 500 μ l)

Arbeitsverdünnung: Angenommen, der Titer sei 1: 150 000, so werden bei Bedarf 200 μ l Stammverdünnung(1:1000) in 30 ml Gammaglobulin-Puffer aufgenommen. (Menge reicht für 60 RIA-Ansätze)

3. 3H -Aldosteron-Arbeitslösung

1 ml 3H -Aldosteron-Stammlösung(250 μ Ci in 50 ml Äthanol)(NEN Chemicals GmbH, Net. 105) in 100 ml Meßkolben mit Äthanol ad 100 ml auffüllen.

100 μ l = 5 nCi = 11 000 dpm ($\approx$ ca 2 000 bis 5 000 cpm je nach Counter)

4. Aldosteron-Standard (Eichlösung)

Stammlösung: ca. 1 mg Aldosteron(nach Trocknen über P_2O_5) auf der Analysenwaage genau einwiegen. Aldosteron nach einem Vorschlag von LOMMER mit Einwaage-Scherbe in 500 ml Meßkolben bringen. Meßkolben ganz in Eisbad eintauchen, langsam mit Äthanol ad 500 ml auffüllen.

Standard-Lösung: Stammlösung in Eisbad, 500 μ l davon in 500 ml Meßkolben pipettieren, im Eisbad langsam mit Äthanol ad 500 ml auffüllen.

5. Aktivkohle-Dextran-Suspension(1.6/o.16%)

300 mg Dextran T 70 (Pharmacia Uppsala) mit 240 ml Gammaglobulin-Puffer aufnehmen und 10 min rühren. 5 g Aktivkohle (Norit A, pract., 4-5 µ, Serva 30890, Heidelberg) mit 80 ml Gammaglobulin-Puffer aufnehmen und 10 min rühren. Beide Mischungen zusammengeben und umrühren. Suspension bei + 4 °C aufbewahren.

6. Szintillator-Cocktail

9 Vol. Instagel(Packard 6002174) mit 1 Vol. aqua bidest. verdünnen. Leichte Trübung ist zunächst normal und verschwindet nach kräftigem Schütteln.

7. Isatin-Farbstoff

gesättigte äthanolische Lösung

8. ³H-Cortisol-Kontrollstandard

50 µl Stammlösung(250 µCi/50 ml) (NEN, Net. 185)

9. ³H-Cotison-Kontrollstandard

50 µl Stammlösung (250 µCi/50ml) (NEN, Net. 183)

10. Organische Lösungsmittel

pA - Qualität(Merck). Zusätzlich vor Gebrauch redestilliert.

3.1.2. Sonstige Hilfsmittel

1. Glaswaren wurden vor Gebrauch mit Methanol und Dichlormethan gespült,

2. Papierfilter: Selecta 304203 (Schleicher&Schüll)

3. Chromatographie-Hilfsmittel:

Papiere: Whatman 1, Macherey&Nagel (MN 212)

DC-Platten: Polygram Sil G UV (Macherey&Nagel)

Celite: Typ 535 pract. (Serva)

Glaswolle: vor Gebrauch in Chromschwefelsäure waschen

Pasteur-Mikropipetten

4. Reaktionsgefäße: Eppendorf 3810

5. Florisil: (Mg-trisilikat) 60-100 mesh, 0.15 - 0.25 mm (Serva 21528)

6. Meßgefäße für Flüssigszintillationszähler: Packard

3. 2. Methoden

1. Radiochromatogrammanalyse

Chromatographiestreifen in Detektorschlitze des Scanners (Mod. Packard 7201) einlegen und bei 2 cm/min Vorschub durchlaufen lassen, Meßbereichsverstärkung der aufgetragenen Radioaktivität anpassen ($\times 10^3$). Endpunkt der Messung auf Chromatogramm und Radiochromatogramm markieren. Lokalisation der Testsubstanzen auf dem Chromatogramm durch Übertragung der Endpunkt-Testpeak-Entfernung auf dem Radiochromatogramm.

2. Chromatogrammanalyse mit Blau-Tetrazolium-Reagens

BT-Reagens: 5 mg Tetrazoliumblauchlorid in 1 ml Äthanol lösen
Vor Gebrauch BT-Reagens 1:3 (Vol/Vol) mit 10%-iger NaOH verdünnen.
Chromatogrammstreifen durch die Lösung ziehen.

3. Adsorbenszugabe

Die Aktivkohlesuspension ist 5 min vor Gebrauch auf dem Magnetrührer zu mischen. Die Rotationsgeschwindigkeit ist während des Pipettierens nicht zu verändern. Die Adsorbenszugabe erfolgt im Kühlraum bei $+4^\circ\text{C}$.

4. Florisil-Aktivierung

Zwei Tage bei 120°C im Heizofen, dann über P_2O_5 im Exsiccator aufbewahren.

5. Radioaktivitätsmessung

500 μl Überstand von Proben und Eichkurvenansätzen in Packard-Meßgefäße überführen. Bei 100%-Werten ist darauf zu achten, daß das Lösungsmittel Äthanol zunächst eingeengt und dann auf das gleiche Meßvolumen 500 μl mit aqua bidest. aufgefüllt wird, damit unterschiedliche Quencheffekte vermieden werden.

Mit einer halbautomatischen Pipette wird je 10 ml Szintillator-Cocktail zugegeben; 3 sec. mischen auf Vortex-Mischer, dann je 10 min Messung im Packard Tri Carb-Flüssigszintillationszähler. (besser ist, bis 10 000 cpm zu messen)

3. 3. Endgültige Modifikation der Methode

1 Extraktion

In 300 ml Kolben exakt 5 ml Plasma (bei erwartetem Hyperaldosteronismus und Nebennierenvenenplasma auch weniger) und 30 ml aqua bidest.; dazu 10 μl ^3H -Aldosteron-Arbeitslösung (ca 1300 cpm); gut durchmischen.
Zur 100% Kontrolle 5 mal 10 μl ^3H -Aldosteron-Arbeitslösung in

Packard-Meßgefäße: = Meßwerte 100% v. E.

Verdünntes Plasma 2 Std. mit 250 ml Dichlormethan auf dem Magnetrührer extrahieren. Phasen trennen lassen. Wässrige Phase mit Pasteur-Pipette über Wasserstrahlpumpe absaugen.

II Alkaliwäsche

10 ml 0,1 n NaOH zum Extrakt geben; 10 min rühren; Phasen trennen lassen; wässrige Phase absaugen.

III Neutralwäsche

10 ml aqua bidest. zum Extrakt geben; 10 min rühren; Phasen trennen lassen; wässrige Phase absaugen; Neutralität prüfen; ggf. Neutralwäsche wiederholen.

IV Filtration über Na_2SO_4

Extrakt über Faltenfilter mit einem geh. Teelöffel wasserfreien Na_2SO_4 (Merck 6649) in 250 ml Herzkolben filtrieren.

V Einengen

Mittels Vakuum-Rotationsverdampfer bei 37°C

VI Chromatographie

Modifiziertes Bush-B-5 System: Isooctan-Benzol-Methanol-Wasser 20:80:55:45(Vol) in 2000 ml Scheidetrichter mischen; mehrere Minuten kräftig schütteln, Phasen 24 Std. trennen lassen

Whatman 1 Papier unter Schablone in 2 cm breite Streifen schneiden; oben und unten einen zusammenhängenden Papierrand(3 cm) belassen; Papier am unteren Rand ausgezackt.

Proben und Standards 9 cm vom oberen Rand entfernt auftragen. Auf jedem Chromatographiepapier 3 Kontrollstandards auftragen: je 50 µl ^3H -Aldosteron-Stammlösung, ^3H -Cortisol-Stammlösung, ^3H -Cortison-Stammlösung und 10 µl Isatinlösung.

Zu jedem Plasma- und Leerwertextrakt 10 µl Isatin auftragen.

Das Auftragen der Extrakte, Standards und des Isatins erfolgt mit Pasteurpipetten unter Verwendung von möglichst wenig Dichlormethan in der Mitte der Papierstreifen. Der Auftragsfleck soll nicht mehr als 0,5 cm Durchmesser haben.

Papiere in den Chromatographie-Tank hängen und über Nacht äquilibrieren; dann die mobile(obere)Phase durch Löcher im Tankdeckel in die Startwannen gießen. Laufzeit: 7 Std. 30 min.

Standard-Streifen auf dem Scanner analysieren.

R_{Isatin} -Werte für Aldosteron berechnen; Mittelpunkte der Aldosteronzonen auf den Probenstreifen mit Hilfe des mittleren R_{Isatin} -Wertes bestimmen. Aldosteron-Zone(je 1 cm nach oben und unten vom Mittelpunkt) ausschneiden

VII Elution

50 ml Bechergläser ausgiebig mit CHCl_3 reinigen und gut trocknen. Papierquadrate mit Aldosteronbereich mit Pinzette auf den Boden der Bechergläser legen. Genau(!) 1.4 ml aqua dest. mit einer Enzympipette darüberschichten. 2 Std. ohne Schütteln stehen lassen, dabei mit Parafilm abdecken; dann Eluat zur Homogenisierung vorsichtig umschwenken; Papierschnitzel mit Pasteurpipette aus dem Becherglas ziehen und Eluat an der Glaswand auspressen.

VIII Wiederfindungsanalyse

500 µl jedes Eluates in Packard-Meßgefäße überführen: Meßwert: R

IX Radioimmunoassay

a) Eichreihe

Aldosteron-Standardlösung in Eisbad äquilibrieren. Nachfolgende Volumina je dreifach in Eppendorf-Gefäße pipettieren:

Vol.:	0	5	10	20	50	100	150	200	300	µl
entsprechend z. B. einer										
Menge:	0	11	22	44	110	220	310	440	660	pg

b) Proben und Leerwerte

Je einmal 200 und einmal 500 µl Eluat jeder Probe bzw. jedes Leerwertes in Eppendorf-Gefäße bringen.

c) Durchführung des RIA

In jeden RIA-Ansatz (Proben, Leerwerte, Eichreihe) werden 100 µl ^3H -Aldosteron-Arbeitslösung pipettiert.

Zugleich 5 mal 100 µl in Packard-Meßgefäße zur 100%-Kontrolle: Meßwert T_{100} (T = Tracer)

RIA-Ansätze zusammen mit "100% v. E.", R- und T_{100} -Meßgefäßen in Exsiccator stellen und nachts im Vakuum eindampfen.

In jeden Ansatz 500 µl Antiserum-Arbeitslösung pipettieren und 16–18 Std. im Kühlraum bei +4 °C inkubieren.

Am nächsten Morgen je 500 µl Aktivkohle-Dextran-Suspension zu den Ansätzen geben, kurz von Hand schütteln und genau 30 min im Kühlraum stehen lassen.

Alle Ansätze rasch hintereinander 2 min bei 16 000 U/min zentrifugieren. Vom Überstand jeder Probe 500 µl in Packard-Meßgefäße pipettieren. Dabei im Kühlraum oder Eisbad arbeiten. Meßwerte B ("B" = protein-bound-radioactivity)

X Messung

In die trockenen Meßproben "100% v. E.", R und T_{100} jeweils 500 µl aqua dest. pipettieren; dann in diese und in die Meßproben B je 10 ml Szintillator-Cocktail pipettieren; mischen; 30 min vor Meßbeginn in den TRI-CARB stellen.

XI Auswertung vgl. Absch. 1.11.

IV DISKUSSION

Bei der Beurteilung des Wertes eines RIAs für eine bestimmte Substanz müssen neben den allgemein gültigen Zuverlässigkeitskriterien drei wesentliche Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

1. Das Ausmaß und die Praktikabilität der notwendigen Vorreinigungen vor dem eigentlichen RIA, die notwendig sind um eine ausreichende Spezifität zu erzielen.
2. Die Dauer der Inkubationszeit und die Qualität der dabei erreichbaren Eichkurven.
3. Die Praktikabilität und die Zuverlässigkeit des Verfahrens zur Trennung von B und F.

Die entwickelte Methode ermöglicht richtige und reproduzierbare Analysen der Plasmaaldosteron-Konzentration für 12 bis 15 Proben pro Serie. Sie schließt wie die meisten bisher publizierten Plasmaaldosteron-RIAs eine chromatographische Reinigung ein (MAYES, 1970; BAYARD, 1970; ITO, 1972; ST. CYR, 1972; JOWETT, 1973), weil die Spezifität des Antiserums nicht ausreicht, um den RIA direkt mit dem Plasmaextrakt auszuführen.

Obwohl eine einzige chromatographische Reinigung gegenüber den Doppelisotopenderivatmethoden bereits eine erhebliche Arbeitersparnis bedeutet, beansprucht die Vorreinigung insgesamt doch wesentlich mehr Zeit als der RIA selbst (3 Tage). Darüberhinaus erwies sich die Chromatographie als mögliche Quelle eines nicht unerheblichen Blanks. Die Einsparung der Chromatographie würde den Laboratoriumsaufwand um etwa die Hälfte vermindern, die Probenkapazität vervielfachen und die Analysenergebnisse in erheblich kürzerer Zeit verfügbar machen. Daher haben inzwischen verschiedene Autoren versucht an Stelle der Chromatographie andere weniger aufwendige spezifitätssteigernde Verfahren vor dem RIA einzusetzen, oder durch Züchtung eines ausreichend spezifischen Antiserums einen vollkommenen Verzicht auf präliminare Reinigungsschritte zu ermöglichen. Letzteres ist bisher nur Vetter et al. (1974) gelungen. In den von FARMER (1973) und

VARSANO-AHARON(1973) entwickelten RIAs wird zusätzliche Spezifität durch Perjodsäure-Oxidation der Steroide erreicht. Nachfolgend wird der RIA mit 11- β -hydroxy-3-keto-4-ätiensäure-18-al-18-11-hemiacetal-2o, 18-lacton, kurz Aldosteron- γ -lacton und einem Aldosteron- γ -lacton-Antiserum (Bzw. einem 100%-ig mit Aldosteron- γ -lacton kreuzreagierenden Aldosteron-Antiserum) ausgeführt.

GOMEZ-SANCHEZ(1973) und MARTIN(1973) setzten an Stelle der Chromatographie einen zweiten Antikörper als spezifisch extrahierendes Reagens ein.

Zweifellos ist auf längere Sicht anzustreben, alle Vorreinigungsschritte durch Züchtung hochspezifischer Aldosteron-Antikörper überflüssig zu machen. Die relative Kreuzreaktivität des uns zur Verfügung stehenden Antiserums machte jedoch eine Vorreinigung unerlässlich. Dies wird durch die nachgewiesene hohe Kreuzreaktivität verschiedener Chromatogrammbereiche dokumentiert.

Den durch die Chromatographie häufig verursachten Blank konnten wir durch Elution mit Wasser vollständig eliminieren. Die Möglichkeit der Elution mit Wasser geht auf eine Beobachtung von LOMMER(1963) zurück.

Im Gegensatz zu verschiedenen bisher publizierten Methoden, in denen die Blankfreiheit nur unzureichend für die Dosis o dokumentiert ist, wurde für diese Methode Blankfreiheit über den gesamten Eichkurvenbereich nachgewiesen($p > 0.1$). Der Aufwand zur Erzielung der Blankfreiheit ist beträchtlich geringer als bei anderen Methoden. Eine vorherige Wäsche des Chromatographiepapiers (MAYES, 1970), die Verwendung von Silicagel-imprägniertem Papier (JOWETT, 1973) und auch "Minichromatographie" der Eluate über Glaswolle und Silicagel (VECSEI, 1972) erwies sich als überflüssig.

Ähnliche Wege zur Blank-Beseitigung geht JOWETT(1973) indem er mit Phosphatpuffer eluiert. Mit der von MAYES(1970) publizierten Methode (Methanolelution + Chromatographie des Eluates über eine Silicagel-Säule) konnten wir keine Blankfreiheit erzielen. Auch bei den Assays von BAYARD (1970) und ITO(1972) - in beiden wird mit Methanol eluiert - sowie bei der von ST. CYR(1972) beschriebenen Methode mit DC bleibt offen, wie die Blank-Eliminierung erfolgt sein soll. Daß Blankfreiheit nach Methanol-Elution

oder nach einer DC zwanglos gegeben sein soll, muß nach unseren Erfahrungen in Zweifel gezogen werden.

Eine relativ lange Inkubationszeit hat zwei nicht unerhebliche Vorteile:

1. Im Gleichgewichts-RIA werden bei dem üblichen Inkubationsschema die steilsten Eichkurven erzielt. Dies ist die Bedingung für optimale Sensitivität und Präzision.
2. Die Unterbrechung der Reaktion mit der Aktivkohle kann ohne Zeltdruck und ohne die Notwendigkeit einer exakten Einhaltung der Inkubationszeit erfolgen.

Ein relativer Nachteil der langen Inkubationszeit liegt in der Verzögerung des Gesamtablaufes der Analyse. Tatsächlich stellt jedoch die lange Inkubationszeit derzeit kein Problem dar. Da eine Ein-Tages-Analyse auf Grund der bisher noch notwendigen Vorreinigungsschritte sowie der relativ langen notwendigen Meßzeiten sowieso nicht möglich und bei den in Frage kommenden klinischen Fragestellungen auch gar nicht notwendig ist, kann die lange Inkubationszeit, die ja keinen Arbeitsaufwand beinhaltet, so lange sie sich nicht über eine Nacht ausdehnt keinesfalls als tatsächlicher Nachteil angesehen werden. Solange die Vorreinigung als Zeit- und Kapazitäts-limitierender Faktor nicht reduziert werden kann, erscheint es daher kaum sinnvoll, viel experimentelle Entwicklungsarbeit in eine Verkürzung der Inkubationszeit zu investieren.

Die Wahl der optimalen Bedingungen für die Trennung von freiem und protein-gebundenem Hormon ist in hohem Maße mitentscheidend für den Erfolg eines Assays, weil Fehlklassifizierungen eine der wichtigsten Fehlerquellen überhaupt bei RIAs sind (RODBARD, 1970).

Angeregt durch die Methode von BAYARD (1970) haben wir zunächst Florisil erprobt. Unsere Ergebnisse über die Adsorptionsfähigkeit des Florisils gegenüber freiem Aldosteron (86-96%) stimmen auch weitgehend mit den Angaben von BAYARD (91%) überein. Auch BARTORELLI (1973) bestätigt die relativ unzuverlässige Adsorptionswirkung des Florisils.

Wegen der leichteren Handhabung und der deutlich besseren Adsorptionseigenschaften (99% Adsorption freien Aldosterons) entschieden wir uns

jedoch für dextranbeschichtete Aktivkohlesuspension als Adsorbens.

Dextranbeschichtete Aktivkohle wird in vielen RIAs als Reagens zur Trennung von B und F gebraucht. Angesichts der Wichtigkeit dieses Versuchs-schrittes überrascht es, daß über die optimale Aktivkohlekonzentration für Aldosteron-Assays keineswegs Einigkeit zu bestehen scheint:

FARMER(1972) verwendet 100 µl 10% ige Aktivkohlesuspension, ST. CYR(1972) 500 µl 0,025 %ige, VARSANO-AHARON(1973) 250 µl 1%ige, BARTORELLI(1973) 500 µl 2,5%ige, VETTER(1974) 250 µl 2,5%ige, NEWSOME(1974) 200 µl 0,8% ige und VECSEI(1972) 100-150 µl 1,6%ige Aktivkohlesuspension.

Auch wenn man diese Werte durch Volumenkorrektur direkt vergleichbar macht, bleibt die Frage offen, welche Menge zwischen 10 mg und 0,125 mg tatsächlich eine optimale Trennung von freiem und proteingebundenem Aldosteron gewährleistet. Systematische Untersuchungen zu diesem Problem wurden bisher von BINOUX(1972) und HERBERT(1968) vorgelegt. Beide machen jedoch keine Aussagen über die Arbeitskonzentrationen für Aldosteronassays. Es erschien uns daher sinnvoll, das Adsorptionsverhalten der Aktivkohle gegenüber freiem und proteingebundenem Aldosteron systematisch zu untersuchen.

Unsere Befunde legen im Gegensatz zu den Ergebnissen, die BINOUX(1972) mit einem HSTH-Assay erzielte, nahe, mit möglichst geringen Aktivkohle-konzentrationen zu arbeiten, weil dann die Trennschärfe größer als bei Verwendung von stärker konzentrierter Aktivkohle ist. Limitierender Faktor für die Verdünnung der Aktivkohlesuspension ist die Adsorptionskapazität. Bei den geringen Substanzmengen, die in einem Aldosteron-Assay zur Adsorption in Frage kommen erwies sich 0,25 mg als ausreichend, um mindestens ca 350 pg Aldosteron pro Ansatz quantitativ zu adsorbieren.

Die Verwendung so geringer Aktivkohlemengen hat zwei unmittelbare Vorteile, die beide auf die verringerte Adsorption von proteingebundener Radioaktivität zurückzuführen sind:

1. Es werden steilere Eichkurven erzielt. Die Präzision der Methode nimmt dadurch zu.
2. Mit schwach konzentrierter Aktivkohle werden höhere Antiserumtiter bestimmt, so daß bei Verwendung des Antiserums in der optimalen Verdünnung (Titer für $\%B_0 = 50$) Antiserum eingespart wird.

Bei der Festlegung des Volumens, in dem die optimale Aktivkohlemenge unterzubringen ist, muß einerseits berücksichtigt werden, daß nach der Trennung von B und F ein möglichst großer Anteil des Überstandes zur Messung herangezogen werden soll, das Suspensionsvolumen also möglichst klein sein sollte, daß es andererseits aber groß genug sein muß, um Aspiration von Aktivkohle beim Pipettieren von Aktivkohle auszuschließen. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen und der Ergebnisse über die optimale Aktivkohlemenge ist 200 µl 0.125%ige Aktivkohlesuspension als Optimum anzusehen.

In Übereinstimmung mit BINOUX(1972), EKINS(1968) und HUNTER&GANGULI (1971) ist nach unseren Befunden die Trennung von B und F mit sehr kleinen Mengen unbeschichteter Aktivkohle bei geringen Proteinkonzentrationen (0.06% γ -Globulin) gut möglich. Dagegen hat die Feststellung von BINOUX(1972), daß "... wenn solch minimale Aktivkohlekonzentrationen verwendet werden, die totale Hormonadsorption gering ist, so daß bei der Kalkulation von B/T eine ziemlich große Menge von nicht adsorbiertem Hormon abgezogen werden muß. Das reduziert die Präzision des Assays..." für den Aldosteronassay nur sehr bedingt Gültigkeit. Mit einer Verminderung der Adsorption auf ca 70 % freien Aldosterons ist nach unseren Befunden auch bei großen Aldosteronmengen im Ansatz (über 300 pg) erste bei 0.05 mg zu rechnen. Die Diskrepanz zwischen diesen eigenen Befunden und den Ergebnissen von BINOUX erklärt sich wohl zwanglos aus der Tatsache, daß die zur Adsorption in Frage kommende Aldosteronmenge erheblich geringer als die Menge HSTH, HGH, LH, TSH oder Gastrin ist, mit denen die vorgenannten Autoren das Adsorptionsverhalten testeten.

Dagegen konnten wir in Übereinstimmung mit BINOUX nachweisen, daß Dextran "beschichtung" nur bei großen Aktivkohlekonzentrationen (500 µl 1 und mehr %ig) einen Vorteil erbringt.

Weitgehend offen ist derzeit noch die Frage, ob die unspezifische Adsorption von Radioaktivität durch die Aktivkohle in Gegenwart von Antiserum im Überschuß im Ansatz auf "Stripping", das heißt Zerstörung von AG-AK-Komplexen und nachfolgende Adsorption von frei gewordenem Hormon, oder auf

unspezifische Adsorption von AG-AK-Komplexen zurückzuführen ist. Eng mit dieser Frage verknüpft ist die Frage nach dem Wirkungsmechanismus des Dextrans. Wirkt das Dextran wie von der Arbeitsgruppe HERBERT et al. (1964, 1968) angenommen wird als "Molekularsieb", oder ist die Wirkung des Dextrans ähnlich derjenigen der Proteine, die "eine gewisse Zahl von Bindungswerten der Aktivkohlepartikel besetzen" (BINOUX, 1972) und dadurch eine allgemeine Schutzwirkung für den AG-AK-Komplex ausüben. Wenn das Dextran tatsächlich als Molekularsieb fungierte, also die unspezifische Adsorption von AG-AK-Komplexen selektiv verhinderte, dann sollte man erwarten, daß der durch eine bestimmte Dextrankonzentration bewirkte Vorteil - ablesbar an der Verminderung der unspezifischen Adsorption - mit fallender Aktivkohlekonzentration zunimmt oder zumindest konstant bleibt. Tatsächlich ist aber das Gegenteil der Fall: 0,25% Dextranzusatz vermindert die unspezifische Adsorption bei 2,5% Aktivkohle um 16,4 % bei 0,25% iger Aktivkohle nur um 3,4 %. Der Vorteil des Dextranzusatzes ist also nur bei hohen Aktivkohlekonzentrationen ausgeprägt vorhanden. Dieser Befund scheint die Ansicht von BINOUX zu bestätigen, daß Dextran als unspezifischer Strippingschutz die Sprengung von AG-AK-Komplexen zu reduzieren aber nicht vollständig beseitigen vermag.

Radioimmunologische Methoden für Ultramikroanalysen enthalten naturgemäß eine ganze Reihe möglicher Fehlerquellen. Im wesentlichen Pipettierfehler (Gauss-Typ + Poisson Typ), Klassifizierungsfehler, Sättigungsfehler und Zählfehler (Poisson-Typ) (RODBARD, 1970).

Unabhängig von der Fehlerquelle können systematische und zufällige Fehler unterschieden werden. Durch die Prüfung der Zuverlässigkeitskriterien sollen diese Fehler quantitativ erfasst werden, damit die Aussagekraft der Analysenergebnisse richtig eingeschätzt werden kann.

Insgesamt bestätigen Zuverlässigkeitskontrollen der vorliegenden Methode, daß im wesentlichen mit keinen größeren aber auch keinen kleineren Fehlern als bei vergleichbaren RIA-Methoden gerechnet werden muß.

Die Freiheit der Methode von systematischen Fehlern wird durch die

lineare Beziehung zwischen zugesetzter und gemessener Aldosteronmenge (Richtigkeitsgerade) dokumentiert. Die Regressionsgerade hat annähernd die Steigung 1 und geht durch den o/o Punkt. Die mittlere Sollabweichung vom mittleren Analysenwert als quantitatives Maß der Richtigkeit wurde mit 2.9 % (Pool VI - 111 pg/ml) bzw. 2.35% (Pool VII - 333 pg/ml) berechnet.

MARTIN(1973) gibt für seine Methode ohne Chromatographie eine mittlere Sollabweichung von 17% an.

Die Annahme des arithmetischen Mittelwertes einer möglichst großen Zahl von Analysen als richtigen Wert("Sollwert") ist gerechtfertigt, weil nach (RODBARD, 1970) die durch den Gesamtfehler bedingte Streuung der Antwortvariablen $y(\%B)$ etwa symmetrisch um den Mittelwert verteilt ist. (Gauss-Normalverteilung)

Eine wesentliche Quelle systematischer Fehler ist mangelnde Spezifität. Die Indizien, die zur Annahme einer ausreichenden Spezifität der vorliegenden Methode berechtigen wurden bereits im experimentellen Teil diskutiert.

Die zufälligen Fehler einer Methode werden durch die Präzisionsprüfung erfasst. Diese sollte einmal unter Intra-Assay-Bedingungen, d.h. innerhalb einer Serie und an Hand einer Eichkurve, und zum anderen unter Inter-Assay-Bedingungen, also zwischen mehreren Serien, deren Ergebniskalkulation verschiedene Eichkurven zu Grunde liegen, erfolgen.

Die durch die Inter-Assay-Prüfung gefundenen zufällige Fehlerbreite ist also von vornherein höher zu veranschlagen, was außer auf die unterschiedlichen Eichkurven auch noch auf andere Ursachen, z.B. neu angesetzte Reagentien, zurückzuführen ist. Im Hinblick auf die Intention der Präzisionsanalyse, nämlich die tatsächlich auftretenden zufälligen Fehler abschätzbar zu machen wurde die Präzisionsanalyse nicht durch ein formales Experiment sondern durch retrospektive Analyse einer großen Zahl von Routineuntersuchungen durchgeführt, obwohl bei diesem Prüfmodus etwas größere Fehlerbreiten zu erwarten waren.

Für die Intra-Assay-Präzision wurde sowohl in Bezug auf die Gesamtmethode

als auch in Bezug auf den RIA allein eine mit der gemessenen Aldosterondosis steigende Tendenz nachgewiesen (d. h. der VK nimmt ab). Dieser Befund stimmt mit den von RODBARD(1970) theoretisch und experimentell in LH und HGH-RIAs und von JOWETT(1972) und KATZ(1972) für Aldosteron-RIAs nachgewiesenen Verhalten der Intra-Assay-Präzision überein. Die Arbeitsgruppe KATZ et al. (1972) gibt für ihren Aldosteron-Assay im Bereich 1–25 pg/ml VK = 26.6%, im Bereich 26–50 pg/ml 17.3%, für 51–100 pg/ml 3.7% und für die höheren Dosisbereiche zwischen 3.1 und 1.9% (VK) an. Vergleicht man diese Angaben mit unseren eigenen Ergebnissen für die Gesamtmethode (1–50 pg/ml : 15.97% VK, 51–250 pg/ml : 7.63% VK, 250–1000 pg/ml : 4.78% VK und über 1000 pg/ml : 3.44% VK) so wird ein hohes Maß an Übereinstimmung deutlich. Die Angaben über die Intra-Assay-Präzision der Methoden ohne Chromatographie sind nicht so einheitlich. MARTIN(1973) gibt für seine Methode für 50 pg/ml 36% VK, für 100 pg/ml 10% VK und für 500 pg/ml 11% VK also obwohl im formalen Experiment und nicht an Hand der Routineergebnisse geprüft wesentlich schlechtere Variationskoeffizienten an. Die Reproduzierbarkeit der Methode ohne Chromatographie von VETTER(1974) (VK 4.7% bei 81 pg/ml und 4.2% bei 232 pg/ml bei Prüfung im formalen Experiment!) soll dagegen sehr gut sein.

Angaben über die Inter-Assay-Präzision werden nur von wenigen Autoren und auch dann meist nur pauschal gemacht. Auf Grund theoretischer Überlegungen (RODBARD, 1970) ist anzunehmen, daß die Inter-Assay-Präzision ebenso wie die Intra-Assay-Präzision mit steigender Aldosterondosis (bis zu einer Maximaldosis, wo wiederum ein Abfall erfolgt) zunimmt. Diese Annahme wird durch die experimentellen Befunde von MARTIN(1972) (VK = 14.8% für 50–100 pg/ml; 10.9% für über 200 pg/ml), VETTER(1974) (VK = 11.2% für 81 pg/ml; 6.8% für 232 pg/ml im formalen Experiment!) und GOMEZ-SANCHEZ(1973) (VK = 16.3% für 41 pg/ml und 9.1% für 142 pg/ml) bestätigt. CORVOL(1972) gibt pauschal 17% VK an.

Die für unsere Methode bestimmten Inter-Assay-VK stimmen nur bedingt mit den vorgenannten überein. Im unteren Dosisbereich (44.5 pg/ml) wurde

mit 15.78 % ein vergleichbarer Wert ermittelt, für 111 pg/ml (VK = 18.74%) und 333 pg/ml (VK = 17.19%) wurden größere Fehlerbreiten berechnet. Bei Betrachtung der Einzelergebnisse wird deutlich, daß diesesvergleichsweise ungünstige Ergebnis auf Analysenergebnisse in der Anfangsphase der Einführung dieser Methode zurückzuführen ist. (Tab. 20) Die Fehlerbreite ist deutlich geringer, wenn man diese Anfangsresultate unberücksichtigt läßt. Bei einer Prüfung der Inter-Assay-Variabilität von sechs an verschiedenen Tagen erstellten Eichkurven wurde ein Anstieg der VK mit steigender Aldosterondosis gefunden. Dieser im Widerspruch zu den oben genannten Erwartungen stehende Befund dürfte auf die bisher geübte Art der Radioaktivitätsmessung zurückzuführen sein. Indem wir alle Proben einheitlich 10 min. lang maßen, enthielten die Ergebnisse von Proben mit großer Aldosterondosis und entsprechend geringer Radioaktivität im Überstand entsprechend größere Zählfehler. Es empfiehlt sich, diese unnötige zusätzliche Abhängigkeit der Präzision von dem Zählfehler dadurch zu normieren, daß alle Proben einheitlich bis z.B. 10 000 cpm gezählt werden. Die Praktikabilität der Methode wurde bereits unter den Gesichtspunkten der Vorreinigung und der Inkubationszeit diskutiert.

Die Untersuchungen zur Physiologie und Pathophysiologie der Aldosteronregulation wurden bereits bei den Ergebnissen ausführlich diskutiert.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Prinzipien und Möglichkeiten der wichtigsten bisher entwickelten Methoden der Aldosteronanalyse im Plasma werden dargestellt und die diagnostische Bedeutung der Aldosteronanalyse im Plasma im Zusammenhang mit der physiologischen und pathophysiologischen Rolle des Aldosterons diskutiert.

Es wird eine Einführung in die theoretischen Grundlagen der Sättigungsanalyse gegeben, wobei insbesondere die für die Optimierung eines Radioimmunoassays wichtigen Parameter hervorgehoben werden. Ausgehend von dieser theoretischen Konzeption werden dann die einzelnen Entwicklungsschritte der Methode weitgehend chronologisch berichtet.

In der endgültigen Modifikation ermöglicht die Methode eine zuverlässige und routinemäßig praktikable Analyse der Aldosteronkonzentration in 3–5 ml Plasma.

Da die Spezifität des zur Verfügung stehenden Aldosteron-Antiserums für eine direkte Analyse im Plasma nicht ausreicht, wird das Aldosteron vor dem eigentlichen Radioimmunoassay durch eine einmalige Extraktion mit 200 ml Dichlormethan, eine Alkaliwäsche und eine einmalige Papierchromatographie weitgehend isoliert. Der Aldosteronbereich des Chromatogramms wird dann um der Entstehung unspezifischer Blanks vorzubeugen mit Wasser eluiert, und das Eluat für die radioimmunologische Analyse verwendet.

Die optimalen Bedingungen für den Assay sind nur in Ausnahmefällen kalkulierbar. In der Mehrzahl der Fälle mußten die günstigsten Parameter durch Vorversuche ermittelt werden. Es wird zunächst die Entwicklung der methodischen Voraussetzungen für den Radioimmunoassay selbst und dann die Auswahl der zusätzlichen spezifitätssteigernden Maßnahmen beschrieben.

Die Adsorptionseigenschaften von Florisil (Mg-trisilikat) und Aktivkohle gegenüber freiem und proteingebundenem Aldosteron wurden eingehend geprüft. Florisil adsorbiert freies Aldosteron je nach Menge und Vorbehand-

lung zu 86–96 %, Aktivkohle demgegenüber zu mehr als 99 %. Geringe Aktivkohlekonzentrationen haben gegenüber großen Konzentrationen den Vorteil des geringeren "Strippings". Auch die Wirkung der Dextranbeschichtung besteht in einer Verminderung ~~des Strippings~~. Ein Vorteil der Dextranbeschichtung ist jedoch nur bei hoher Aktivkohlekonzentration über etwa 1 % nachweisbar. Die optimale Relation von Trennschärfe und Adsorptionskapazität wurde bei Verwendung von 0,25 mg Aktivkohle erzielt. Durch Anwendung von Aktivkohle in optimaler Konzentration können steilere Eichkurven erhalten werden und zugleich kann Antiserum eingespart werden.

Ein entscheidendes Kriterium für den Erfolg eines Radioimmunoassays ist die Auswahl des geeigneten Antiserumtiters. Der Titer des verwendeten Aldosteron-Antiserums betrug anfangs 1: 150 000 und fiel im Laufe von 2 Jahren bei Lagerung (-20°C) auf etwa 1: 70 000 ab. Verdünnte Antiserum-Arbeitslösungen sind bei 4°C drei Tage ohne nennenswerten Titerabfall haltbar.

Zur Auswahl der geeigneten Inkubationsbedingungen wurden Inkubationszeitvergleiche durchgeführt. Es wird ein Verfahren beschrieben, mit dem die optimale Inkubationszeit schnell und exakt ermittelt werden kann. Unter der Voraussetzung, daß "inaktives" und radioaktiv markiertes Antigen zugleich mit dem Antikörper inkubiert werden, liefert der Gleichgewichts-Radioimmunoassay die steilsten Eichkurven. Um das Antiserum gegen Lösungsmiteleinflüsse zu schützen, weitgehend gleiche Proteinkonzentration in Proben und Eichkurvenansätzen herzustellen und die Antigen-Antikörper-Komplexe gegenüber der Aktivkohle zu schützen, wird zur Inkubation ein Puffer mit 0,06 % γ -GI obulin-Zusatz verwendet.

Durch Dünnschicht und Papierchromatographie sowie durch organische Lösungsmittel können Blank-Phänomene im Radioimmunoassay verursacht werden. Die Schlußfolgerung aus zahlreichen Versuchen den Blank zu beseitigen ist: Die sekundäre Beseitigung eines Blanks ist wenig aussichtsreich; Es kommt darauf an, die Blank-Entstehung primär durch Vermeidung organischer Lösungsmittel bei der Elution zu verhindern.

Die vollkommene Blank-Freiheit der Methode wird über den gesamten Eichkurvenbereich nachgewiesen.

Die Möglichkeiten der graphischen und der elektronischen Radioimmunoassay-Auswertung durch Logit-Log-Transformation werden diskutiert.

Die neue Methode wurde ausführlich nach den gültigen Zuverlässigkeitskriterien geprüft, ihre Validität durch den Nachweis der Richtigkeit der Messungen bewiesen: Die mittlere Sollabweichung wiederholt durchgeführter Analysen mit Aldosteron-Zusatzplasmen beträgt $2.35 \pm 2.9\%$. Der Variationskoeffizient bei Mehrfachbestimmungen eines Poolplasmas (Inter-Assay-Reproduzierbarkeit) beträgt 17.23% , der Variationskoeffizient bei Mehrfachbestimmungen innerhalb einer Serie $7.6 \pm 4.7\%$ (Intra-Assay-Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode) bzw. $6.77 \pm 3.49\%$ (Intra-Assay-Reproduzierbarkeit des Radioimmunoassays allein). Diese Angaben beziehen sich auf den mittleren Meßbereich ($50 - 1000 \text{ pg/ml}$). Der Intra-Assay-Variationskoeffizient nimmt mit steigender Aldosterondosis ab.

Die theoretische Sensitivitätsgrenze (minimale meßbare Menge) wird mit $5.36 \pm 2.6 \text{ (SD) pg/Ansatz}$ oder $37.5 \text{ pg pro Plasmaprobe}$ berechnet.

Als praktische Sensitivitätsgrenze wurde 5.55 pg/Ansatz oder $38.8 \text{ pg pro Plasmaprobe}$ nachgewiesen. Diese Menge ließ sich experimentell signifikant von Null unterscheiden ($p < 0.01$).

Die Spezifität der Methode wird an Hand von sieben experimentellen Indizien nachgewiesen.

Die mittlere Gesamtwiederfindung nach der Chromatographie beträgt $39.46 \pm 8.79 \text{ (SD) \%}$ ($n 372$)!

In Anwendung der neuen Methode wurden Aldosteron-Tagesprofilstudien bei sechs gesunden Normalpersonen und drei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus durchgeführt und mit den Cortisol und Renin-Profilen verglichen.

Die Ergebnisse der Studien legen den Schluß nahe, daß bei Normalpersonen die Aldosteronsekretion primär über das Renin reguliert wird, während Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus eine ACTH-Steuerung ihres Plasmaaldosteron-Spiegels aufweisen.

Die Orthostasereaktion des Plasmaaldosterons wird unter verschiedenen diätetischen Bedingungen (ad lib. Diät, NaCl-Belastung, Elektrolyt-Bilanz-Diät) untersucht.

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß die Regulation des Plasmaaldosterons durch die Körperlage gegenüber der Regulation durch die Elektrolyte dominiert.

Bei einer Patientin mit Conn-Syndrom wird eine atypische Orthostasereaktion nachgewiesen.

Die Methode wird unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren abschließend diskutiert.

VI TABELLENANHANG

Tab. 1 Anhang : Doppelanalysen zur Untersuchung der Intra-Assay-Präzision

Probe	Erstanalyse				Zweitanalyse				Auswertung			
Nr.	c_1	d_1	$\frac{1}{2} \frac{11A^{11}c+d_1}{pg/ml}$	Ber. VK _A Rec	c_2	d_2	$\frac{1}{2} \frac{11B^{11}c+d_2}{pg/ml}$	Ber. VK _B Rec	$\frac{x-A+B}{2}$	Ber. VK _x	$\frac{1}{2}$	%
43-o	261.1	264.8	262.9	III 0.7 44.5	263.1	-	-	II - 50.4	249.5	II	5.37	
42-r	50.6	-	-	II - 41.8	52.1	-	-	II - 25.2	51.3	II	1.46	
42-o	475.6	492.1	483.8	III 1.7 38.7	440.9	438.2	439.5	III 0.3 40.18	461.6	III	4.79	
41-r	103.0	123.9	113.4	II 9.21 35.4	121.9	-	-	II - 28.28	117.6	II	3.61	
40-r	130.7	140.8	135.7	II 3.72 37.2	123.4	146.8	135.1	II 8.66 34.30	135.4	II	0.22	
39-r	299.0	301.7	300.3	III 0.44 37.94	352.2	-	-	III - 33.60	326.2	III	7.98	
38-rp	38.5	-	-	I - 42.7	28.4	-	-	I - 42.84	33.4	I	15.09	
38-rN	738.7	-	-	III - 31.08	839.8	-	-	III - 23.24	789.2	III	6.40	
37-o	415.0	422.4	418.7	III 0.88 33.18	357.3	362.0	359.6	III 0.65 31.64	389.1	III	7.59	
36-r	39.1	-	-	I - 45.5	73.9	-	-	II - 31.92	51.6	II	14.22	
30-o	313.6	333.1	323.3	III 3.01 33.18	361.3	289.1	275.2	III 5.05 41.02	299.2	III	8.03	
35-r	43.4	44.0	43.7	I 0.68 54.04	44.4	57.4	50.9	II 12.77 50.68	47.3	I	7.61	
35-o	245.8	250.5	248.1	II 0.94 43.82	235.6	236.9	236.2	II 0.27 47.46	242.2	II	2.45	
34-r	52.3	58.0	55.1	II 5.16 28.28	47.9	66.4	57.1	II 16.18 29.40	56.1	II	1.78	
34-o	217.0	216.8	216.9	II 0.04 32.48	171.3	202.5	186.9	II 8.34 32.4	201.9	II	7.42	
33-r	382.9	354.8	368.8	III 3.80 42.70	366.7	375.4	371.0	III 1.17 37.94	369.9	III	0.29	
33-o	184.2	232.5	208.3	II 11.59 38.92	233.2	251.3	242.2	II 3.73 32.90	225.2	II	7.52	
32-r	7.0	-	-	I - 57.40	8.2	13.8	11.0	I 25.45 56.56	9.0	I	22.22	
32-o	210.0	236.4	223.2	II 5.91 45.36	187.1	237.9	212.5	II 11.95 46.76	217.8	II	2.45	
30-r	2736.3	-	-	IV - 33.74	2489.0	-	-	IV - 35.28	2612.6	IV	4.73	
29-ra	69.1	54.1	61.6	II 12.17 42.70	70.1	58.5	64.3	II 9.02 42.56	62.9	II	2.14	
29-rb	71.1	63.7	67.4	II 5.43 42.98	65.6	83.1	74.3	II 11.76 38.78	70.8	II	4.86	

Nr.	Erstanalyse				Zweitanalyse				Auswertung			
	c ₁	d ₁	"A"=c ₁ d ₁ pg/ml	Ber. VK _A	Rec	c ₂	d ₂	"B"=c ₂ d ₂ pg/ml	Ber. VK _B	Rec	$\frac{x=A+B}{2}$	Ber. VK _x
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	-	%	pg/ml	pg/ml	pg/ml	-	%	pg/ml	-
24	219.3	246.7	233.0	II	5.88	38.78	199.4	-	II	-	216.2	II
23-p	531.1	545.7	538.4	III	1.35	37.24	585.7	547.5	566.6	III	552.5	III
23-IN	591.4	547.8	568.9	IV	4.01	38.22	5559.5	5646.2	560.29	IV	5644.1	IV
22-rN	1190.4	-	-	IV	-	32.06	1079.5	-	IV	-	1134.9	IV
22-IN	5090.5	5897.5	5494.0	IV	7.34	34.30	5168.6	-	IV	-	5331.3	IV
21-rN	10020.9	11597.9	10809.4	IV	7.29	35.56	11266.6	12208.1	11737.3	IV	11273.3	IV
21-IN	19928.9	21678.1	20803.5	IV	9.20	37.52	18719.6	18644.3	18681.9	IV	19742.7	IV
20-o	39.4	-	-	I	-	45.22	37.9	-	I	-	38.6	I
19-IN	12247.9	12494.6	12371.2	IV	0.99	32.62	13828.2	13395.2	13111.7	IV	12741.4	IV
18-rN	14601.3	13606.9	14104.1	IV	3.52	43.54	15010.8	13659.5	14335.1	IV	14219.6	IV
25	159.6	155.5	157.5	II	1.30	25.48	131.3	163.3	147.3	II	152.4	II
16	108.4	-	-	II	-	25.76	108.3	-	II	-	108.35	II
15-r	80.6	-	-	II	-	28.98	80.1	73.9	77.0	II	78.8	II
15-o	659.4	580.3	619.8	III	6.38	32.48	548.6	620.8	584.7	III	602.2	III
14-r	96.6	94.7	95.6	II	0.99	41.30	87.3	119.9	103.6	II	99.6	II
14-c	130.2	134.7	132.4	II	1.69	35.56	148.7	144.7	146.7	II	139.5	II
13	602.9	613.7	608.3	III	0.88	30.52	640.7	636.3	638.5	III	623.4	III
12-r	57.5	37.3	47.4	I	21.3	45.22	37.2	27.0	32.1	I	39.7	I
11-o	791.5	802.0	796.7	III	0.65	36.82	748.0	684.1	716.0	III	756.3	III
Ha-e	336.3	362.7	349.5	III	3.77	33.18	341.0	334.6	337.8	III	343.6	III
Ha-3o	339.0	406.2	402.6	III	0.85	29.68	466.8	410.6	438.7	III	420.6	III
Ha-e	509.5	443.5	476.5	III	6.92	38.08	409.9	341.4	375.6	III	426.0	III
HI-ae	70.4	97.8	84.1	II	16.29	39.20	99.5	99.2	99.35	II	91.7	II
HI-r 2	29.9	16.8	23.3	I	28.05	39.90	38.9	23.8	31.3	I	27.3	I
HI-o	273.8	226.0	249.9	II	9.56	34.72	194.8	218.7	206.7	II	228.3	II
HI-r 3	26.0	21.1	23.5	I	10.40	40.18	20.1	33.9	27.0	I	25.2	I

Probe	Erstanalyse				Zweitanalyse				Auswertung				
	c ₁	d ₁	"A"=c+d ₁	Ber. VK _A Rec	c ₂	d ₂	"B"=c+d ₂	Ber. VK _B Rec	$\frac{x=A+B}{2}$	Ber. VK _x	-	%	
Nr	pg / ml	pg / ml	pg / ml	%	pg / ml	pg / ml	pg / ml	%	%	pg / ml	-	%	
HI-e	211.7	181.4	196.5	II	235.8	188.1	211.9	II	11.25	38.08	204.2	II	3.77
De-ar	2.5	-	-	I	6.6	-	-	I	-	28.42	4.5	I	45.05
De-E	63.3	-	-	II	68.3	-	-	II	-	28.56	65.8	II	3.79
De-r1	33.0	-	-	I	30.3	-	-	I	-	30.80	31.6	I	4.26
De-r3	7.5	-	-	I	6.1	-	-	I	-	28.14	6.8	I	10.29
Na-ar	61.5	68.3	64.9	II	96.8	76.6	86.7	II	11.64	39.90	75.8	II	14.38
Aa-aE	316.8	300.4	308.6	III	303.6	319.8	311.7	III	2.59	38.92	310.1	III	0.50
Na-r2	70.6	70.0	70.3	II	102.8	76.5	89.6	II	14.66	33.88	79.9	II	12.07
Ar-ar	52.4	77.0	64.7	II	94.3	74.7	84.5	II	11.59	29.12	74.6	II	13.27
Ar-aE	234.7	203.3	219.0	II	269.5	197.5	233.5	II	15.41	31.22	226.2	II	3.20
Ar-o	179.9	133.8	156.8	II	128.3	107.8	118.0	II	8.68	25.34	137.4	II	14.11
Ho-r2	50.9	42.4	46.6	I	62.0	66.7	64.3	II	3.65	32.34	55.4	II	15.96
Ho-o	210.1	202.6	211.3	II	176.7	165.8	171.2	II	3.18	43.59	191.2	II	10.48
Ho-r3	95.3	78.1	86.7	II	82.4	69.1	75.7	II	8.77	25.20	81.2	II	6.77
Ho-E	243.1	256.2	249.6	II	198.0	189.3	193.6	II	2.24	38.22	211.6	II	12.63
Ho-ar	36.0	23.9	29.9	I	56.9	47.5	52.2	II	9.00	30.94	41.0	I	27.16
Ho-aE	185.2	152.9	169.0	II	110.5	125.3	117.9	II	6.27	34.58	143.4	II	17.81
Ho-r1	35.4	61.4	48.4	I	88.9	74.6	81.7	II	8.78	23.94	65.0	II	25.59
B-Ba	215.4	213.7	214.5	II	216.0	213.5	214.7	II	0.58	56.98	214.6	II	0.04
A-r0	189.4	199.0	194.2	II	216.4	191.3	203.8	II	6.15	46.90	199.0	II	2.41
Ma	480.7	479.7	480.2	III	433.3	432.6	432.9	III	0.08	40.04	456.5	III	5.18
Ha	1890.9	1985.2	1938.0	IV	2122.6	2110.1	2116.3	IV	0.29	37.38	2027.1	IV	4.39

L I T E R A T U R

1. **AAKVAAG, A.:**
Gas chromatographic determination of aldosterone in urine with electron-capture-detection (abstract).
Acta endocr. K' hvn., Suppl. 119, 96 (1967)
2. **AAKVAAG, A.:**
Gas-liquid chromatography of aldosterone in biological fluids.
Clin. chim. Acta, 34, 197-206 (1971)
3. **ABRAHAM, G.E.:**
Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17- β
J. clin. Endocr., 29, 866-870 (1969)
4. **ADDISON, T.:**
On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules.
London (1855)
5. **AFRICA, B., E. HABER:**
The production and the characterisation of specific antibodies to aldosterone.
Immunochemistry, 8, 479-486 (1971)
6. **AGUILERA, G., E. MARUSIC, J. LITVAK, C. IBANNEZ, Y.D. TRAVELLA:**
Experiencia en el montaje de la técnica doble isotópica para la determinación de aldosterona en orina.
Rev. méd. Chile, 100, 167-170 (1972)
7. **AITCHISON, J., J.J. BROWN, J.B. FERRIS, R. FRASER, A.W. KAY, A.F. LEVER, A.M. NEVILLE, T. SYMINGTON, J.I.S. ROBERTSON:**
Quadric analysis in the preoperative distinction between patients with and without adrenocortical tumors in hypertension with aldosterone excess and low plasma renin.
Amer. Heart J., 82, 660-671 (1971)
8. **AVIVI, P., A. SIMPSON, J.F. TAIT, J.K. WHITEHEAD:**
The use of ^3H and ^{14}C labeled acetic anhydride as analytical reagents in microbiology.
In: Proceedings of the Radioisotope Conference, 1, 313-323 (1954)
9. **AXELROD, B., J. LUETSCHER:**
Increased aldosterone output during sodium deprivation in normal man.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 87, 650-653 (1954)
10. **BALEIKIAN, H.M., A. BRODIE, S. DALE et al.:**
Effect of posture on the metabolic clearance rate plasma concentration and blood production rate in man.
J. Clin. Endocr., 28, 1630-1640, (1968)

11. BANKS, P., R.P. EKINS, J.D.H. SLATER:
Development of a rapid, sensitive and specific method for the measurement of aldosterone by radioimmunoassay.
Acta endocr. K' hvn., Suppl. 155, 94 (1971)
12. BARTORELLI, A., G. LEONETTI, R. ACINNI:
Il dosaggio radioimmunologica dell'aldosterone plasmatico.
Boll. Ist. Sieroter. milan., 52, 127-141 (1973)
13. BAYARD, F., I.Z. BEITINS, A. KOWARSKI, C.J. MIGEON:
Measurement of plasma aldosterone by radioimmunoassay.
J. clin. Endocr., 31, 1-6 (1970)
14. BERSON, S.A., R.S. YALOW:
Isotopic tracers in the study of diabetes.
In: *Advances Biol. Med. Phys.,* 6, Oxford, 349-430 (1958)
15. BERSON, S.A., R.S. YALOW, S.M. GLICK, J. ROTH:
Immunoassay of protein and peptide hormones.
Metabolism, 13, 1135-1153 (1964)
16. BERSON, S.A., R.S. YALOW:
General principles of radioimmunoassay.
Clin. chim. Acta, 22, 51-69 (1968)
17. BESSER, G.M.:
Detection of hormone fragments.
J. Endocr. 54, v (1972)
18. BIGLIERI, E.G., P.E. SLATON, S.J. KORNFIELD, J.B. DECK:
Primary aldosteronism with unusual secretory pattern
J. clin. Endocr., 27, 715-721 (1967)
19. BIGLIERI, E.G., P.E. SLATON, S.J. KORNFIELD, M. SCHAMBELAN:
Diagnosis of an aldosterone producing adenoma in primary aldosteronism.
J. Amer. med. Ass., 201, 510-514 (1967)
20. BIGLIERI, E.G., J.R. STOCKIGT, M. SCHAMBELAN:
Adrenal mineralcorticoids causing hypertension.
Amer. J. Med. 52, 623-632 (1972)
21. BIGLIERI, E.G., M. SCHAMBELAN, N. BRUST, B. CHANG, S. THOMAS:
The mineralcorticoid hormones and hypertension
In: *Hypertension, Current problems / Aktuelle Probleme, Symposium Mainz, 1973*
Edrs.: A. DISTLER, H.P. WOLFF, Stuttgart (1974)

22. BINOUX, M.A., W.D. ODELL:
Use of dextran-coated charcoal to separate antibody-bound from hormone: a critique
J. clin. Endocr. 36, 303-310 (1972)
23. BLAIR-WEST, J.R., J. COGHLAN, D. DENTON:
The control of aldosterone secretion.
Recent Progr. Hormone Res. 19, 311-383 (1963)
24. BLAIR-WEST, J.R., J.P. COGHLAN, D.A. DENTON, J.R. GODING, M. WINTOUR, R.D. WRIGHT:
Effect of variations of plasma sodium concentration on the adrenal response to angiotensin II
Circ. Res. 17, 386-393 (1965)
25. BLAIR-WEST, J.R., M.D. CAIN, J.K. CATT et al.:
The dissociation of aldosterone secretion and systemic renin and angiotensin II levels during the correction of sodium deficiency.
Acta endocr. Kt hvn., 66, 229-247 (1971)
26. BLEDSOE, T.G. LIDDLE, A. RIONDEL et al.:
Comparative fates of intravenously and orally administered aldosterone: evidence for extrahepatic formation of acid hydrolyzable conjugates in man.
J. clin. Invest., 45, 264-269 (1966)
27. BOJESEN, E., H. DEGN:
A double isotope derivative method for the determination of aldosterone in peripheral plasma.
Acta endocr. Kt hvn., 37, 541-558 (1961)
28. BOJESEN, E.:
Aldosterone in peripheral plasma of normal man.
In: *Aldosterone* (Edrs.: E.E. BEAULIEU, P. ROBEL), Oxford, 163-167 (1964)
29. BOJESEN, E.:
Concentration of aldosterone and corticosterone in peripheral plasma of rats. The effects of salt depletion, salt repletion, potassium loading and intravenous injections of renin and angiotensin II.
Europ. J. Steroids, 1, 145-169 (1966)
30. BRAVO, E.L., R.H. TRAVIS:
A quantitative gas-liquid chromatographic method for aldosterone in human urine.
J. Lab. clin. Med., 70, 831-839 (1967)
31. BRODIE, A.H., N. SHIMIZU, S.A.S. TAIT, J.F. TAIT:
A method for the measurement of aldosterone in peripheral plasma using ^3H -acetic anhydride.
J. Clin. Endocr. 27, 997-1011 (1967)

32. BRODIE, A.H., J.F. TAIT:
Assay of aldosterone and related compounds.
In: *Methods in Hormone Research* (Ed.: R. DORFMANN), Vol. II, chpt. 5,
New-York, London, 623-682 (1969)
33. BROWN, J.J., R.H. CHINN, D.L. DAVIES, G. DÜSTERDIECK, R. FRASER,
A.F. LEVER, J.I.S. ROBERTSON, M. TREE, A. WISEMAN:
Plasma electrolytes, renin, and aldosterone in the diagnosis of primary hyperaldosteronism.
Lancet 2, 55 - 59 (1968)
34. BROWN-SEQUARD, C.E.:
Experimental research on the physiology and pathology of the adrenal capsules.
Compt. rend. Soc. biol. 43, 422-36 (1856)
35. BÜHLER, F.R., J.H. LARAGH, J.E. SEALEY, H.R. BRUNNER:
Plasma Aldosterone-Renin Interrelationships in various forms of essential hypertension:
Studies using a rapid assay of plasma aldosterone.
Amer. J. Cardiol. 32, 554-561 (1973)
36. BUSH, I.E.:
Methods of paper-chromatography of steroids applicable to the study of steroid in
mammalian blood and tissues.
Biochem. J., 50, 370-378 (1952)
37. CAIN, J.P., M.L. TUCK, G.H. WILLIAMS, R.G. DLUHY, S.H. ROSENQFF:
The regulation of aldosterone secretion in primary aldosteronism.
Amer. J. Med., 53, 627-637 (1972)
38. CARR, A.A.:
Effect of PGA_1 on renin and aldosterone in man.
Prostaglandins, 3, 621-628 (1973)
39. CATT, K., H.D., NIALL, G.W. TREGAR:
A solid phase disc radioimmunoassay for human growth hormone.
J. Lab. clin. Med., 70, 820-830 (1967)
40. CATT, K., G.W. TREGAR:
Solid phase radioimmunoassay on antibody-coated tubes.
Science, 158, 1570-1572 (1967)
41. CHANNICK, B.J., E. ADLER, A. MARKS:
Suppressed plasma renin activity in hypertension.
Arch. intern. Med., 123, 131-140 (1969)
42. CHARD, T.:
Relationship of radioimmunoassay to biological assays.
J. Endocr., 54, vii (1972)

44. COGHLAN, J.P., SCOGGINS, B.A.:
Measurement of aldosterone in peripheral blood of man and sheep.
J. clin. Endocr., 27, 1470-1486 (1967)
45. COGHLAN, J., J. BLAIR-WEST, D. DENTON et al.:
Perspectives in aldosterone and renin control.
Aust. NZ. J. Med., 2, 178-197 (1971)
46. COGHLAN, J.P., A.E. DOYLE, G. JERUMS, B.A. SCOGGINS:
The effects of sodium loading and deprivation on plasma renin and plasma urinary aldosterone in hypertension.
Clin. Sci., 42, 15-23 (1972)
47. CONN, J.W.:
Primary aldosteronism, a new clinical syndrome.
J. Lab. clin. Med., 45, 6-17 (1955)
48. CONN, J.W.:
Primary aldosteronism.
J. Lab. clin. Med., 45, 661-664 (1955)
49. CONN, J.W.:
Aldosteronism and hypertension: Primary aldosteronism versus hypertensive disease with secondary aldosteronism.
Arch. Intern. Med., 107, 813-828 (1961)
50. CONN, J.W., R.F., KNOFF, R.M. NESBIT:
Clinical characteristics of primary aldosteronism from an analysis of 145 cases.
Amer. J. Surg., 107, 159-172 (1964)
51. CONN, J.W., D.R. ROVNER, E.L. COHEN et al.:
Normokalemic primary Aldosteronism. Its masquerade as essential hypertension.
J. Amer. Med. Ass., 195, 21-26 (1966)
52. COOKE, C.R., J.S. HORVATH, M.A. MOORE, T. BLEDSOE, W.G. WALKER:
Modulation of plasma aldosterone concentration by plasma potassium in anephric man in the absence of a change in potassium balance.
J. clin. Invest., 52, 3028-3032 (1973)
53. COPPAGE, W., D. ISLAND, A. CONNER et al.:
The metabolism of aldosterone in normal subjects and in patients with hepatic cirrhosis.
J. clin. Invest., 41, 1672-1680 (1962)
54. CORVOL, P., J. MENARD, Mlle. C. AUZAN, Mme. M.F. GONZALES:
Réalisation et application du dosage radioimmunologique de l'activité rénine plasmatique.
Ann. Endocr. (Paris), 33, 285-286 (1972)
55. CREPY, O., A. SCHWOB, M.A. DUCRET, J.L. GUERIGUIAN, I. MOWSZOWICZ, F. DRAY:
Etude critique de quelques méthodes de dosage de la testostérone plasmatique.
Ann. Endocr. (Paris), 30, 165-175 (1969)

56. DAVIS, W.W., H.H. NEWSOME, L.D. WRIGHT, W.R. HAMMOND, J. EASTON, F.C. BARTTER:
Bilateral adrenal hyperplasia as a cause of primary aldosteronism with hypertension, hypokalemia and suppressed renin activity.
Amer. J. Med., 42, 642-647 (1967)
57. DAVIS, J.O.:
What signals the kidney to release renin?
Circulat. Res., 28, 301-6 (1971)
58. DEANE, H.W., J.H., SHOIW, R.O. GREEP:
The effect of altered sodium or potassium intake on the width and cytochemistry of the zona glomerulosa of rat's adrenal cortex.
Endocrinology, 43, 133-153 (1948)
59. DISTLER, A.:
Primärer und sekundärer Aldosteronismus.
Internist. Praxis, 12, 239-246 (1972)
60. DISTLER, A., H.J. JUST, Th. PHILIPP:
Studies on the mechanism of Aldosterone-induced Hypertension in man.
Clin. Sci. Mol. Med., 45, 743-750 (1973)
61. DISTLER, A., H.J. JUST, Th. PHILIPP:
Untersuchungen zur Pathogenese des Hochdrucks bei primärem Aldosteronismus.
Dtsch. med. Wschr., 98, 100-105 (1973)
62. DLUHY, R.G., L. AXELROD, R.H. UNDERWOOD, G.H. WILLIAMS:
Studies of the control of plasma-aldosterone concentration in normal man.
II. Effect of dietary potassium and acute potassium infusion.
J. clin. Invest., 51, 1950-1957 (1972)
63. DORFMANN, R.I., A. M. POTTS, M.L. FEIL:
Studies on the bioassay of hormones: The use of radiosodium for the detection of small quantities of Desoxycorticosterone.
Endocrinology, 41, 464-469 (1947)
64. EDWARDS, R., E.D. GILBY, S.L. JEFFCOATE:
Iodine-125 tracers in steroid radioimmunoassay.
In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine.
Proceedings of a symposium, Istanbul 10.-14. September 1973, Vol. II,
Int. Atomic Energy Agency Vienna, 31-40 (1974)
65. EKINS, R., B. NEWMAN:
Theoretical aspects of saturation analysis.
In: Steroid Assay by Protein Binding - Transactions of the second Symposium held in Geneva on March 23.-25. 1970.
Acta endocr. K' hvn., Suppl. 147, 11-36 (1970)

66. EKINS, R. P., G. B. NEWMAN, R. PIYASENA, P. BANKS, J. SLATER:
The radioimmunoassay of aldosterone in serum and urine:
theoretical and practical aspects
J. Steroid Biochem., 3, 289-304 (1972)
67. EKINS, R. P.:
Methods of data acquisition and analysis
J. Endocr., 54, x-xi. (1972)
68. ERLANGER, B. F., F. BOREK, S. M. BEISER, S. LIEBERMAN:
Steroid-protein conjugates I. Preparation and characterisation of
conjugates of bovine serum albumin with testosterone and cortisone.
J. biol. Chem., 228, 713-27 (1957)
69. FARMER, R. W., W. G. ROUP jr, E. D. PELLIZZARI, L. F. FABRE jr :
A rapid aldosterone radioimmunoassay
J. clin. Endocr., 34, 18-22 (1972)
70. FARMER, R. W., D. H. BROWN, P. Y. HOWARD, L. F. FABRE jr :
A radioimmunoassay for plasma aldosterone without chromatography
J. clin. Endocr., 36, 460-5 (1973)
71. FAULSTICH, H., A. SCHÄFER, H. HOBLER, P. VECSEI :
Verwendung von Nylon-gekoppelten Aldosteron-Antikörpern für
Aldosteron-Bestimmungen
Vortrag gehalten auf dem II. Colloquium Endocrinologicum südwest-
deutscher Arbeitsgruppen, Heidelberg 18. 10. 74 (im Druck)
72. FICHMAN, M., G. LITTENBERG, I. WOO, R. HORTON :
The effect of prostaglandin (PGA₁) on adrenal function in man
in: Advances in Biosciences - 9. Int. Conf. on Prostaglandins,
Vienna Sept. 25-28, 1972 (Edrs.: S. Bergström and S. Bernhard)
Oxford, Braunschweig 1973, 313-20
73. FRASER, R., V. H. T. JAMES :
Double-isotope-assay of aldosterone, corticosterone and cortisol in
human peripheral plasma
J. Endocr., 40, 59-72 (1968)
74. FRASER, R. :
Radioimmunoassay of aldosterone
J. Endocr., 54, xxi - xxii (1972)
75. FUNDER, J. W., J. R. BLAIR-WEST, J. P. COGHLAN, B. A. DENTON,
B. A. SCOGGINS, R. D. WRIGHT:
Effect of plasma K⁺ on the secretion of aldosterone
Endocrinology, 85, 381-4 (1969)

76. GANGONG, W., E. BIGLIERI, P. MULROW :
Mechanisms regulating ACTH, adrenocortical secretion, secretion of aldosterone and glucocorticoids
Recent Progr. Hormone Res., 22, 381-430 (1966)
77. GANGULY, P. C. :
Diskussionsbeitrag in: Radioimmunoassay Methods (Edrs.: K. E. Kirkham and W. M. Hunter) ~~Edinburgh~~ 1971, 191
78. GANGULY, A., G. A. MELADA, J. A. LUETSCHER, A. J. DOWDY:
Control of plasma aldosterone in primary aldosteronism: Distinction between adenoma and hyperplasia
J. clin. Endocr., 37, 765-75 (1973)
79. GANGULY, A., A. J. DOWDY, J. A. LUETSCHER, G. A. MELADA :
Anomalous postural response of plasma aldosterone concentration in patients with aldosterone-producing adrenal adenoma
J. clin. Endocr., 36, 401-4 (1973)
80. GANN, D., C. DELES, J. GILL et al.:
Control of aldosterone secretion by changes of body potassium in normal man
Amer. J. Physiol., 207, 104-8 (1964)
81. GARDINER, W. L., E. C. HORNING :
Gas-liquid-chromatographic separation of C-19 and C-21 human urinary steroids by a new procedure
Biochim. biophys. Acta(Amst.), 115, 524-6 (1966)
82. GLAZ, E., P. VECSEI :
Aldosterone
Budapest 1971
83. GOMEZ-SANCHEZ, C., D. C. KEM, N. M. KAPLAN :
A radioimmunoassay for plasma aldosterone by immunologic purification
J. clin. Endocr., 36, 795-98 (1973)
84. GOODFRIEND, L., A. SEHON :
Early approaches to production, analysis, and use of steroid-specific antisera
in: Immunologic Methods in Steroid Determination (Edrs.: F. G. Peron and B. V. Caldwell), New York 1970, 15-40
85. GORDON, R. D., L. K. WOLFE, D. P. ISLAND, G. W. LIDDLE :
A diurnal rhythm in plasma renin activity in man
J. clin. Invest., 45, 1587-92 (1966)

86. HANING, R., J. MC CRACKEN, M. St. CYR et al. :
The evolution of titer and specificity of aldosterone binding anti-
bodies in hyperimmunized sheep
Steroids, 20, 73-6 (1972)
87. HARTMANN, F. A., H. J. SPOOR, L. A. LEWIS :
Sodium factor of the adrenal
Science, 89, 204 (1939)
88. HARTMANN, F. A., H. J. SPOOR :
Cortin and the Na-factor of the adrenal
Endocrinology, 26, 871-9 (1940)
89. HARTMANN, F. A. :
Functions of the adrenal cortex
Endocrinology, 30, 861-69 (1942)
90. HELBER, A., W. KAUFMANN :
Radioimmunologische Methode zur Aldosteronbestimmung im Urin.
Aldosteronsekretion bei Patienten mit essentieller Hypertonie.
Klin. Wschr., 51, 1164-9 (1973)
91. HERBERT, V., Ch. GOTTLIEB, K. S. LAU, L. R. WASSERMAN:
Intrinsic factor assay
Lancet, 2, 1017-18 (1964)
92. HERBERT, V., K. S. LAU, Ch. GOTTLIEB, S. J. BLEICHER :
Coated charcoal immunoassay of insulin
J. clin. Endocr., 25, 1375-84 (1965)
93. HORNING, E. C., B. F. MAUME :
Derivatives of aldosterone for gas-phase analysis
J. Chromatogr. Sci., 7, 411-18 (1969)
94. HORTON, R. :
Stimulation an suppression of aldosterone in plasma of normal man
and in primary aldosteronism
J. clin. Invest., 48, 1230-6 (1969)
95. HORTON, R. :
Laboratory determination of aldosterone and their clinical signifi-
cance
Amer. J. clin. Path., 54, 297-302 (1970)
96. HORTON, R., E. FINCK, :
Diagnosis and localisation in primary aldosteronism
Ann. Intern. Med., 76, 885-909 (1972)

97. HORTON, R.:
Aldosterone : Review of its physiology and diagnostic aspects of
primary aldosteronism
Metabolism, 22, 1525-45 (1973)
98. HÜBNER, H. J., W. H. STAIB:
Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone
Stuttgart 1965
99. HURN, B. A. L., J. LANDON :
Antisera for radioimmunoassay
in: *Radioimmunoassay Methods* (Edrs.: K. E. Kirkham and W. M. Hunter)
European Workshop Sept. 15-17, 1970, Edinburgh,
London, 1971, 121-42
100. HUNTER, W. M., P. C. GANGULY:
The separation of antibody - bound from free antigen
in: *Radioimmunoassay Methods* (Edrs.: K. E. Kirkham and W. M. Hunter)
European Workshop Sept. 15-17, 1970, Edinburgh,
London, 1971, 243-51
101. ITO, T., J. WOO, R. HANING, R. HORTON :
Radioimmunoassay for aldosterone in human peripheral plasma in-
cluding a comparison of alternate techniques
J. clin. Endocr., 34, 106-12 (1972)
102. JAHNECKE, J.:
Risikofaktor Hypertonie
Ed. Boehringer Mannheim 1974
103. JEFFCOATE, S. L.:
Hapten specificity of antisera to steroid-protein conjugates
in: *Radioimmunoassay methods* (Edrs.: K. E. Kirkham and W. M. Hunter)
European Workshop Sept 15-17, 1970, Edinburgh,
London 1971, 151-55
104. JOHNSTON, L. C., H. G. GREIBLE :
Treatment of arterial hypertensive disease with diuretics V. Spirono-
lactone an aldosterone antagonist
Arch. intern. Med., 119, 225-31 (1967)
105. JOSE, A., N. M. KAPLAN :
Plasma renin activity in diagnosis of primary aldosteronism: failure
to distinguish primary aldosteronism from essential hypertension
Arch. intern. Med., 123, 141-6 (1969)
106. JOWETT, T. P., J. D. H. SLATER, R. D. PIYASENA, R. P. EKINS :
Radioimmunoassay of aldosterone in plasma and urine : Validation of
a novel separation technique and a rapid urine assay
Clin. Sci. mol. Med., 45, 607-23 (1973)

107. JUNG, R. C., D. B. DILL, R. HORTON, S. M. HORVATH :
Effects of age on plasma aldosterone levels and hemoconcentration
at altitude
J. appl. Physiol., 31, 593-7 (1971)
108. KAPLAN, N. M. :
The biosynthesis of adrenal steroids. Effects of angiotensin II, adreno-
corticotropin and potassium
J. clin. Invest., 44, 2629-39 (1965)
109. KATZ, F. H. :
Primary aldosteronism with suppressed plasma renin activity due
to bilateral nodular hyperplasia
Ann. intern. Med., 67, 1035-42 (1967)
110. KATZ, F. H., P. ROMFH, J. A. SMITH:
Episodic secretion of aldosterone in supine man: Relationship to
cortisol
J. clin. Endocr., 35, 178-81 (1972)
111. KATZ, F. H., P. ROMFH :
Plasma aldosterone and renin activity during menstrual cycle
J. clin. Endocr., 34, 819-21 (1972)
112. KATZ, F. H., P. ROMFH, P. E. ZIMMERING, W. G. KELLY :
Radioimmunoassay of plasma aldosterone: effect of sexual differences
and increasing duration of upright posture
Steroids Lipids Res., 3, 90-100 (1972)
113. KELLIE, A. E. :
The preparation of steroid immunogens
J. Endocr., 54, viii (1972)
114. KEM, D. C., M. H. WEINBERGER, D. MAYES, R. H. LERMAN, C. A.
NUGENT :
ACTH and renin in the circadian rhythm of plasma aldosterone
Clin. Res., 18, 603 (1970)
115. KEM, D. C., M. H. WEINBERGER, C. GOMEZ-SANCHEZ, N. J. KRAMER
R. LERMAN, S. FURUYAMA, C. A. NUGENT :
Circadian rhythm of plasma aldosterone concentration in patients with
primary aldosteronism
J. clin. Invest., 52, 2272-77 (1973)
116. KENDALL, E. C. :
Adrenal cortex extract
J. Amer. med. Ass., 105, 1486-89 (1935)

117. KENDALL, E. C. , A. L. MASON, C. S. MYERS :
Concerning the chemical nature of the hormone of the adrenal cortex
Proc. Mayo Clin. , 11, 351-52 (1936)
118. KENDALL, E. C. :
The function of the adrenal cortex
Proc. Mayo Clin. , 15, 297-304 (1940)
119. KLIMAN, B. , R. E. PETERSON :
Isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts
Fed. Proc. , 17, 255 (1958)
120. KLIMAN, B. , R. E. PETERSON:
Double isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts
J. biol. Chem. , 235, 1639-48 (1960)
121. KLIMAN, B. , D. W. FOSTER :
Analysis of aldosterone by gas-liquid chromatography
Ann. Biochem. , 3, 403-7 (1962)
122. KÖDDING, R. , W. LAMPRECHT, H. P. WOLFF, J. KARL K. R. KOCZOREK :
Bestimmung von Corticosteroiden im Blut durch Doppelmarkierung und Messung von ¹⁴C und ³H in der Gasphase.
Z. analyt. Chem. , 181, 574-80 (1961)
123. KÖDDING, R. , H. P. WOLFF, J. KARL, M. TORBICA :
Bestimmung von Aldosteron, Cortisol und Corticosteron im Plasma durch Doppelmarkierung mit ¹⁴C und ³H und Messung der Aktivität in der Gasphase
in: Gewebs- und Neurohormone - Physiologie des Melanophoren-hormons, 8. Symp. d. dtsh. Ges. f. Endokrinologie, München 1.-3. März 1961 (Edr.: H. Nowakowski), Berlin 1962,
124. LÄDER, S. , B. A. HURN, G. COURT :
A comparative assessment of immunisation procedures for radio-immunoassay
in: Radioimmunoassays and related procedures, Proceedings of a symposium, Istanbul 10-14 September 1973, Int. Atomic Energy Agency, Vienna 1974, Vol. II 31-44
125. LARAGH, J. H. , M. ANGERS, W. G. KELLY, S. LIEBERMAN :
Hypotensive agents and pressor substances
J. Amer. med. Ass. , 174, 234-40 (1960)
126. LARAGH, J. H. , J. G. G. LEDINGHAM, S. C. SOMMERS :
Secondary aldosteronism and reduced plasma renin in hypertensive disease
Trans. Ass. Amer. Phycns. , 80, 168-82 (1967)

127. LARAGH, J., J. SEALEY, H. BRUNNER :
The control of aldosterone secretion in hypertensive man: abnormal renin aldosterone patterns in low-renin-hypertension
Amer. J. Med., 53, 649-63 (1972)
128. LEDINGHAM, J., M. BULL, J. LARAGH :
The meaning of aldosteronism in hypertensive disease. Incidence of low renin hypertension
Circulat. Res., 21 Suppl. 2, 177 (1967)
129. LEYENDECKER, G., S. WARDLAW, W. NOCKE :
Gamma-globulin protection of radioimmunoassay and competitive protein binding saturation analysis of steroids
J. clin. Endocr., 34, 430-33 (1972)
130. LIEBERMAN, S., B.F. ERLANGER, S.M. BEISER, F.J. AGATE jr :
Steroid protein conjugates: their chemical, immunochemical and endocrinological properties
Recent Progr. Hormone Res., 15, 165-96 (1959)
131. LOMMER, D. :
Zur Biosynthese und Analyse von Corticosteroiden
Diss. München 1962
132. LOMMER, D., H.P. WOLFF :
Methoden der Aldosteronbestimmung und ihre klinische Bedeutung
Ergeb. Labor.-Med., 1, 12-23 (1964)
133. LOMMER, D., G. DÜSTERDIECK, J. JAHNECKE, P. VECSEI, H.P. WOLFF :
Sekretion, Plasmakonzentration, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung von Aldosteron bei Gesunden und Kranken
Klin. Wschr., 46, 741-51 (1968)
134. LOMMER, D., A. BERNDT, A. DISTLER, B. MÜLLER, T. PHILIPP, H.P. WOLFF :
Sekretion, Verteilung und Abbau von Aldosteron bei verschiedenen Hochdruckformen
Klin. Wschr., 50, 1037-42 (1972)
135. LOMMER, D. :
Sekretionsraten von Aldosteron
Vortrag gehalten auf dem 18. Symp. der dtsh. Ges. f. Endokrinologie, Hannover 2.-4. 3. 1972
136. LOMMER, D. :
Aldosteron- und Reninbestimmung bei primärem und sekundärem Aldosteronismus
Vortrag gehalten auf der 12. Int. Jahrestagung d. Ges. f. Nuklearmedizin, München 11.-14. 9. 1974 (im Druck)

137. LOMMER, D., P. VECSEI :
Diskussionsbeiträge auf dem II. Colloquium Endocrinologicum
südwestdeutscher Arbeitsgruppen, Heidelberg 18. 10. 1974
138. LUETSCHER, J. A. :
Bioassay of sodium retaining corticoids and some changes in ex-
cretion of these substances in disease
Transactions of the 2nd Conference on renal function, Josiah Macy,
Jr Foundation New York, 1951
139. LUETSCHER, J. A., A. GANGULY, G. A. MELADA, R. BECKER-
HOFF, A. J. DOWDY :
Preoperative differentiation of hyperaldosteronism due to adenoma
from bilateral adrenal hyperplasia
in: Mechanisms of hypertension (Edr. M. P. Sambhi) Amsterdam,
Excerpta medica 1973, 179-85
140. MARSCHNER, I. F. ERHARDT, P. C. SCRIBA :
Calculation of the radioimmunoassay standard curve by "spline
function"
in: Radioimmunoassay and related procedures, Proceedings of a
symposium, Istanbul 10-14. September 1973, Int. Atomic Energy
Agency, Vienna 1974, Vol I 111-22
141. MARTIN, B. T., C. A. NUGENT :
A non-chromatographic radioimmunoassay for plasma aldosterone
Steroids, 21:2, 169-80 (1973)
142. MAUME, B. F., G. M. MAUME, J. DURAND, P. PADIEU :
A new type of micro-analysis of steroid hormones in biological materials
by gas-chromatography with flame ionisation and electron capture
detection
J. Chromatogr., 58, 277-82 (1971)
143. MAYES, D., S. FURUYAMA, D. C. KEM, C. A. NUGENT :
A radioimmunoassay for plasma aldosterone
J. clin. Endocr., 30, 682-5 (1970)
144. MC CAA, R., C. MC CAA, D. READ et al. :
Increased plasma aldosterone concentration in response to hemodialysis
in nephrectomized man
Circulat. Res., 31, 473-80 (1972)
145. MC CAA, R. E., J. D. BOWER, C. S. MC CAA :
Relative influence of acute sodium and volume depletion on aldosterone
secretion in nephrectomized man
Circulat. Res., 33, 555-62 (1973)
146. MELBY, J. C., R. F. SPARK, S. L. DALE, R. H. EGDAHL, P. C.
KAHN :
Diagnosis and localisation of aldosterone-producing adenomas by
adrenal-vein catheterisation
New Eng. J. Med., 277, 1050-6 (1967)

147. MELBY, J. C., S. DALE, R. GREKIN :
18-hydroxydesoxycorticosterone secretion in experimental and human hypertension
Recent Progr. Hormone Res., 28, 287-51 (1972)
148. MELBY, J. C., S. DALE, T. E. WILSON :
18-hydroxydesoxycorticosterone in human hypertension
Circulat. Res., 28 Suppl. 2, 143-52 (1971)
149. MELBY, J. C., S. DALE :
Altered adrenal steroidogenesis in "low renin hypertension"
(Abstract s-23/3) in: Symposia abstr. book, Mexico City 1974
150. MERÉTY, K., L. T. KOCSÁR :
Some problems of specific antibody production in radioimmunoassay techniques
in: Radioimmunoassay and related procedures, Proceedings of a symposium, Istanbul 10-14 September 1973, Int. Atomic Energy Agency, Vienna 1974, Vol I 23-29
151. MERITS, I. :
Gas-liquid chromatography of adrenal cortical steroid hormones
J. Lipid Res., 3, 126-31 (1962)
152. MICHELAKIS, A. M., R. HORTON :
The relationship between plasma renin and aldosterone in normal man
Circulat. Res., 27 Suppl. 1, 185 (1970)
153. MICHELAKIS, A. M., R. HORTON :
Simultaneous measurement of plasma renin and aldosterone in normal man
Circulat. Res., 27, 1185-94 (1970)
154. MIDGLEY, A. R., G. D. NISWENDER, S. R. RAM :
Hapten radioimmunoassay: a general procedure for the estimation of steroidal and other haptenic substances
Steroids, 13, 731-37 (1969)
155. MIDGLEY, A. R., G. D. NISWENDER :
Radioimmunoassay of steroids
Acta Endocr. K'hnv, Suppl. 147, 320-31 (1970)
156. MILLER, R. E., A. J. VANDER, R. S. KOWALCZYK, W. W. GEELHOED :
Aldosterone secretion and plasma renin during renin infusion and acute salt depletion
Amer. J. Physiol., 214, 228-31 (1968)

157. MITRA, S. , S. GENUTH, L. BERMAN et al. :
Aldosterone secretion in anephric patients
New Engl. J. Med. , 286, 61-64 (1972)
158. MURPHY, B. P. , W. ENGELBERG, J. PATEE :
Simple method for the determination of plasma corticoids
J. clin. Endocr. , 23, 293-300 (1963)
159. MURPHY, B. E. :
Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay
J. clin. Endocr. , 27, 973-90 (1967)
160. MURPHY, B. E. :
Protein binding and the assay of non-antigenic hormones
Recent Progr. Hormone Res. , 25, 563-610 (1969)
161. MURPHY, B. E. :
Methodological problems in competitive protein binding techniques:
The use of sephadex column chromatography to separate steroids
Acta endocr. K'lvn, Suppl. 147, 37-60 (1970)
162. NEHER, R. :
Bestimmungsmethoden des Aldosterons
in: Aldosteron - Neuntes Symposium d. dtsh. Ges. f. Endokrinologie
in Wiesbaden und Mainz vom 3.-5. Mai 1962, Berlin 1963, 21-39
163. NEHER, R. :
Steroid chromatography
Amsterdam, London, New-York , 2nd revised Edit. 1964
164. NEWSOME, H. H. , A. S. CLEMENTS, D. M. HUME :
Specificity of antisera to aldosterone and deoxycorticosterone(DOC)
in: Radioimmunoassay and related procedures, Proceedings of a
symposium, Istanbul 10-14 September 1973, Int. Atomic Energy
Agency, Vienna 1974, Vol II 79-85
165. NEWTON, M. A. , J. H. LARAGH :
Effects of glucocorticoid administration on aldosterone excretion and
plasma renin in normal subjects, in essential hypertension and in
primary aldosteronism
J. clin. Endocr. , 28, 1014-22 (1968)
166. NEY, R. L. , N. SHIMIZU, W. E. NICHOLSON, D. R. ISLAND,
G. W. LIDDLE :
Correlation of plasma ACTH concentration with adrenocortical
response in normal human subjects, surgical patients and patients
with Cushing's disease
J. clin. Invest. , 42, 1669-77 (1963)

167. NICOLIS, G.L., J.L. GABRILOVE :
Measurement of plasma aldosterone by gas chromatography with
electron capture detection
J. clin. Endocr., 29, 1519-25 (1969)
168. NUGENT, C.A., D.M. MAYES :
Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroid binding
globulin and dextran coated charcoal
J. clin. Endocr., 26, 1116-22 (1966)
169. ODA, T. :
On the role of aldosterone to hypertension, especially an extent
of its participation
Jap. circulat. J. (En), 35, 513-18 (1971)
170. PALEM, M., C.L. LAPIÈRE, P. CONINX, M. MARGOULIÈS :
A sensitive assay of 18-hydroxydeoxycorticosterone and aldo-
sterone by gas chromatography with electron capture detection
Rev. Europ. Études Clin. et Biol. XV, 851-56 (1970)
171. PETERSON, R.E. :
Determination of peripheral plasma aldosterone
in: *Aldosterone* (Edrs.: E.E. Beaulieu, P. Robel), Oxford 1964,
145-61
172. PIZARRO, M.A., J. KOLANOWSKI :
Problems arising from blanks in protein binding analysis
J. steroid Biochem., 3, 349-56 (1972)
173. RAPP, J.P., K.B. EIK-NES :
Determination of deoxycorticosterone and aldosterone in biological
samples by gas chromatography with electron capture detection
Analyt. Biochem., 15, 386-408 (1966)
174. REEVES, B.D. :
Reliability criteria for saturation analysis of steroids by competitive
protein binding
Acta endocr. K'hn, Suppl. 147, 61-78 (1970)
175. REICHSTEIN, T., J. von EUW :
Über Bestandteile der Nebennierenrinde. XX. Isolierung der
Substanzen Q(Desoxycorticosteron) und R sowie weiterer Stoffe
Helv. chim. Acta, 21, 1197-1210 (1938)
176. RODBARD, D. :
Computer analysis of radioimmunoassay and competitive protein
binding assay data
Acta endocr. K'hn, Suppl. 147, 79-103 (1970)

177. **RODBARD, D., J.A. COOPER :**
A model for prediction of confidence limits in radioimmunoassays and competitive protein binding assays
in: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*, Int. Atomic Energy Agency, Vienna 1970, 659-74
178. **RODBARD, D., D.M. HUTT :**
Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labeled antibody) assays
in: *Radioimmunoassay and related procedures*, Proceedings of a symposium, Istanbul 10-14 September 1973, Int. Atomic Energy Agency, Vienna 1974, Vol I 165-92
179. **SALOKANGAS, A., H. ADLERCREUTZ :**
A rapid gas-liquid chromatographic method for the routine estimation of aldosterone in urine
(abstract) *Acta endocr. K'hn, Suppl.* 119, 97 (1967)
180. **SCHAMELAN, M., N. BRUST, B. CHANG, E.G. BIGLIERI :**
Aldosterone production in low renin hypertensive states: response to spironolactone therapy
in: *Mechanisms of hypertension* (Edr.: M.P. Sambhi), Amsterdam, Excerpta medica 1973, 187-93
181. **SCHMIDLIN, J., G. ANNER, J.R. BILLETER, A. WETTSTEIN :**
Über Synthesen in der Aldosteron-Reihe. I. Totalsynthese des racemischen Aldosterons
Experientia(Basel), 1, 365-80 (1955)
182. **SCHOLER, D., M. BIRKHÄUSER, A. PEYTREMANN, A.M. RIONEL, M.B. VALLOTON, A.F. MÜLLER :**
Response of plasma aldosterone to angiotensin II, ACTH, and potassium in man
Acta endocr. K'hn, 72, 293-307 (1973)
183. **SCOGGINS, B.A., C.H. ODDIE, W.S.C. HARE, J.P. COGHLAN :**
Preoperative lateralisation of aldosterone-producing tumors in primary aldosteronism
Ann. int. Med., 76, 891-7 (1972)
184. **SEALEY, J.E., F.R. BÜHLER, J.H. LARAGH, E.L. MANING, H.R. BRUNNER :**
Aldosterone excretion - physiological variations in man, measured by radioimmunoassay or double-isotope dilution
Circulat. Res., XXXI, 367-78 (1972)
185. **SIMPSON, S.A., J.F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. von EUW, T. REICHSTEIN :**
Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel
Experientia, 9, 333-35 (1953)

186. SINTERHAUF, K., T. MÜLLER, H. J. SPIRA, D. MÜLLER, D. LOMMER :
Vergleich mathematischer Transformationen und Approximationen bei der Auswertung von Radioimmunoassays
Vortrag gehalten auf dem II. Colloquium Endocrinologicum südwest-deutscher Arbeitsgruppen, 18. 10. 74 Heidelberg (im Druck)
187. SKINNER, S. L. :
Improved assay methods for renin "concentration" and "activity" in human plasma
Circulat. Res., 20, 391-402 (1967)
188. SLATON, P. E. jr, M. SCHAMBELAN, E. G. BIGLIERI :
Stimulation and suppression of aldosterone secretion in patients with an aldosterone-producing adenoma
J. clin. Endocr., 29, 239-50 (1969)
189. SÖNKSEN, P. H. :
Non-specific interference in radioimmunoassay systems
J. Endocr., 54, v-vi (1972)
190. SPARK, R. F., J. C. MELBY :
Hypertension and low plasma renin activity: presumptive evidence for mineralcorticoid excess
Ann. int. Med., 75, 831-36 (1971)
191. SPARK, R. F. :
Low renin hypertension and the adrenal cortex
New. Engl. J. Med., 287, 343-9 (1972)
192. STAHL, E. :
Handbuch der Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Berlin, Heidelberg, New-York, 1967
193. STAHL, E. :
Suggestions for the standardisation of procedures and terminology of thin-layer chromatography
J. Chromatogr., 33, 273-79 (1968)
194. ST. CYR, M. J., J. M. SANCHEZ, J. C. MELBY :
Quantitation of plasma aldosterone by radioimmunoassay
Clin. Chem., 18, 1395-1402 (1972)
195. TAIT, J. F., S. A. S. TAIT, B. LIDDLE, K. P. LAUMAS :
The disappearance of 7-³H-aldosterone in the plasma of normal subjects
J. clin. Invest., 40, 72-80 (1961)
196. THORNEYCROFT, I. H., S. A. TILLSON, G. E. ABRAHAM, R. J. SCARAMUZZI, B. V. CALDWELL :
Preparation and purification of antibodies to steroids
Chpt. 4 in: Immunologic methods in steroid determination (Edrs.: F. G. Peron, B. V. Caldwell), New York 1970, 63-86

197. TOBIAN, L.:
Interrelationships of electrolytes, juxtaglomerular cells and hypertension
Physiol. Rev., 40, 280-312 (1960)
198. UPSPRUNG, H., K. D. SMITH, W. H. SOFER, D. T. SULLIVAN:
Assay systems for the study of gene function
Science, 160, 1075-81 (1968)
199. VAGNUCCI, A. H., R. H. MC DONALD, A. L. DRASH, A. K. C. WONG:
Intradial changes of plasma aldosterone, cortisol, corticosterone and growth hormone
J. clin. Endocr., 38, 761-76 (1974)
200. VANDER, A. J.:
Control of renin release
Physiol. Rev., 47, 359-82 (1967)
201. VARSANO-AHARON, N., S. ULICK :
A simplified radioimmunoassay of plasma aldosterone
J. clin. Endocr., 37, 372-79 (1973)
202. VECSEI, P., B. PENKE, A. JOUMAAH :
Radioimmunoassay of free aldosterone and of its 18-oxo-glucuronide in human urine
Experientia, 28, 622-24 (1972)
203. VECSEI, P., W. OTTING :
An unidentified corticosteroid characterized by its affinity to aldosterone antibodies
IRCS International Research Communications System, April 1973
204. VETTER, H., J. M. BAYER, M. BERGER, C. WERNING, W. VETTER:
Plasmaaldosteron bei einer Patientin mit primärem Aldosteronismus während und nach der Adenomentfernung
Dtsch. med. Wschr., 98, 2420-21 (1973)
205. VETTER, H., M. BERGER, H. ARMBRUSTER, W. SIEGENTHALER, C. WERNING, W. VETTER:
Episodic secretion of aldosterone in primary aldosteronism: relationship to cortisol
J. clin. Endocr., 3, 41-48 (1974)
206. VETTER, H., W. VETTER, W. SIEGENTHALER:
Preparation of an antiserum specific to aldosterone and its application in radioimmunoassay
in: Radioimmunoassay and related procedures, Proceedings of a symposium, Istanbul 10-14 September 1973, Int. Atomic. Energy Agency, Vienna 1974, Vol II 87-96

207. VETTER, W., E.HABER, R. BECKERHOFF et al.:
Direct radioimmunologic demonstration of plasma aldosterone
Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 78, 1513-5 (1972)
208. VETTER, W., H. VETTER, W. SIEGENTHALER :
Radioimmunoassay for aldosterone without chromatography
2. Determination of plasma aldosterone
Acta endocr. K'hn, 74, 558-67 (1973)
209. VETTER, W., K. ZARUBA, H. ARMBRUSTER, R. BECKERHOFF,
G. RECK, W. SIEGENTHALER :
Episodische Aldosteronsekretion bei einem nierenlosen Patienten
in: Hypertension - Symposium Mainz 1973 (Edr.: A. Distler, H. P.
Wolff), Stuttgart 1974, 119-22
210. WALDHÄUSL, W., H. HAYDL, E. DEUTSCH, H. HASCHEK:
Incidence of primary aldosteronism in an unselected group of hyper-
tensive patients
in: Hypertension - Symposium Mainz 1973 (Edr.: A. Distler, H. P.
Wolff), Stuttgart 1974, 114-19
211. WEIDMAN, P., R. HORTON, S. FRANKLIN et al.:
Dynamic studies of aldosterone in anephric man
Clin. Res., 20, 201 (1972)
212. WERNING, C. :
Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Stuttgart 1972
213. WEST, CH. D., D. K. MAHAJAN, V. J. CHAVRÉ et al.:
Simultaneous measurement of multiple plasma steroids by radio-
immunoassay demonstrating episodic secretion
J. clin. Endocr., 36, 1230-36 (1973)
214. WIDE, L., R. AXÉN, J. PORATH :
Radioimmunosorbent assay for proteins - chemical couplings of
antibodies to insoluble dextran
Immunochemistry, 4, 381-86 (1967)
215. WILLIAMS, G. H., J. P. CAIN, R. G. DLUHY, R. H. UNDERWOOD:
Studies of the control of plasma aldosterone concentration in normal
man I. Response to posture, acute and chronic volume depletion,
and sodium loading
J. clin. Invest., 51, 1731-42 (1972)
216. WILLIAMS, G. H., M. L. TUCK, L. I. ROSE, R. G. DLUHY, R. H.
UNDERWOOD :
Studies of the control of plasma aldosterone concentration in normal
man III. Response to sodium chloride infusion
J. clin. Invest., 51, 2645-52 (1972)

217. WINTERSTEINER, O., H.M. VARS, J.J. PFIFFNER :
Chemical investigation on the cortical hormone of adrenal gland
J.biol.Chem., 105, c-ci (1934)
218. WINTERSTEINER, O., J.J. PFIFFNER:
Chemical studies on the adrenal cortex III. Isolation of two new
physiologically inactive compounds
J.biol.Chem., 116, 291- 305 (1936)
219. WOLFF, H.P. :
Der sekundäre Aldosteronismus Herz-, Leber- und Nierenkranker
Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 68, 630-49 (1962)
220. WOLFF, H.P., M. TORBICA :
Determination of loosely bound aldosterone in the blood of healthy
and sick people
Klin. Wschr., 41, 40-42 (1963)
221. WOLFF, H.P., M. TORBICA :
Determination of plasma aldosterone
Lancet 22:1, 1346-48 (1963)
222. WOLFF, H.P., D.LOMMER, M. TORBICA :
Untersuchungen über das Plasmaaldosteron und den Aldosteron-
stoffwechsel bei Gesunden, Herz-, Leber- und Nierenkranken
Schweiz. med. Wschr., 95, 387-95 (1965)
223. WOLFF, H.P. :
Aldosterone in congestive heart failure
Acta cardiol.(Brux.), XX, 424-34 (1965)
224. WOLFF, H.P., CH. BARTH, G. BIRO et al. :
Normokaliämischer primärer Aldosteronismus
Klin. Wschr., 46, 357-70 (1968)
225. WOLFF, H.P., S. ABDELHAMID :
Hypermineralcorticoidismus und Hypertonie
Klin. Wschr., 49, 293-306 (1971)
226. WÖRSDORFER, O., G. DIEDRICHSEN, D. LOMMER :
Eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung der Sekretions-
rate und Exkretionsrate von Aldosteron
Z.klin. Chem.klin.Biochem., 10, 555-61 (1972)
227. WOODS, J.C., G.W.LIDDLE, E.G.STANT et al. :
Effect of an adrenal inhibitor in hypertensive patients with suppressed
renin
Arch.intern.Med., 123, 366-70 (1969)

228. WOTIZ, H.H., I. NAUKKARINEN, H.E. CARR :
Gaschromatography of aldosterone
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 53, 449-52 (1961)
229. ZAFFARONI, A., R.B. BURTON, E.H. KEUTMAN :
Adrenal cortical hormones analysis by paper chromatography
and occurence in the urine of normal persons
Science, 111, 6-8 (1950)
230. ZALUSKY, R., V. HERBERT :
Isotope dilution methods using coated charcoal
in: Radioisotopes in medicine - in vitro studies (Edrs.: R.L.
Hayes, F.A. Goswitz, B.E.P. Murphy) AEC Symposium series,
13, Oak Ridge Tenn. 1968, 395-412
231. YALOW, R.S., S.A. BERSON :
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. clin. Invest. , 39.2 , 1157-75 (1960)
232. YALOW, R.S., S.A. BERSON :
Review paper - general aspects of radioimmunoassay procedures
in: In vitro procedures with radioisotopes in clinical medicine and
research - Bericht vom Kongress der Int. Atomic Energy Agency,
Vienna 8.-12. 9. 1969,
Wien 1970, 455-81

LEBENS LAUF

Am 15. 12. 1949 wurde ich, Bodo Ludwig Wolfgang von Ehrlich-Treuenstätt, Sohn des Regierungsdirektors Dr. Heinrich v. E.-T. und dessen Ehefrau Eva-Maria, geb. Gräfin Bülow von Dennewitz, als erstes von zwei Kindern in Heppenheim/Bergstraße geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich zunächst in Heppenheim, später in Jugenheim/Bergstraße die Grundschule, dann von 1961 bis 1968 den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums im Schuldorf-Bergstraße, Seeheim. Am 19. Juni 1968 habe ich an diesem Gymnasium das Abitur mit "sehr gut" abgelegt.

Im gleichen Jahr nahm ich auf Einladung von "Jugend Forscht" als 1. Preisträger eines journalistischen Nachwuchswettbewerbes an der "Int. Science Fair" in Detroit/USA teil.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Medizinstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz.

Im Frühjahr 1969 wurde ich als Stipendiat in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen.

Nach zwei Semestern legte ich am 6. 10. 1969 in Mainz das Vorphysikum mit "sehr gut", nach weiteren drei Semestern das Physikum ebenfalls mit "sehr gut" ab.

Während dieses Mainzer Studienabschnittes war ich fünf Semester hochschulpolitisch als Studentenparlamentsabgeordneter, Vorsitzender des RCDS-Universität Mainz, Mitglied der Fakultät und verschiedener Kommissionen aktiv.

Nach einem klinischen Semester in Mainz studierte ich im Winter 71/72 und im Sommersemester 1972 Medizin an der Universität Wien;

Seit dem Wintersemester 72/73 wieder an der Universität Mainz.

Am 20. Juni 1974 konnte ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Mainz mit "sehr gut" ablegen.

Im Juli 1974 wurde mir von der Universität Mainz ein Graduiertenstipendium zur Fertigstellung dieser Arbeit gewährt.

Mainz, Weihnachten 1974

B. v. Ehrlich-Treuenstätt

